

*Kurt Meinicke*

Treponemen - Antigen - Antikörper-

Reaktionen und ihre Bedeutung

für die Diagnose und Therapie

der Lues

*München 1955*

Habilitationsschrift der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Datum der Habilitation: 18. 7. 1955

Ernennung zum Privatdozenten: 10. 8. 1955

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. A. MARCHIONINI)

### Züchtungsversuche des *Treponema pallidum* auf künstlichem Nährboden\*

Von KURT MEINICKE

Zwei grundlegende Entdeckungen haben in den letzten Jahren die Diagnostik und Therapie der Lues so weitgehend beeinflußt, daß die schon seit Jahrzehnten gesammelten Erfahrungen und Erkenntnisse auf diesem Gebiet neu überprüft und ergänzt werden müssen. Die therapeutischen Möglichkeiten wurden durch die Einführung des Penicillins und anderer Antibiotica mit treponemicider Wirkung wesentlich erweitert. In vielen Fällen ging man dazu über, die bisher durchgeführte Therapie mit Salvarsan-Wismut zu verlassen und ganz, oder doch zumindest in erster Linie, die neuen Therapeutica zu verwenden. Man

war bemüht, die Wirkung des Penicillins kennzulernen und sich über den klinisch sichtbaren Heilungsverlauf hinaus Klarheit zu verschaffen. So gewannen auch Fragen der serologischen Diagnostik, zum Teil als Folge neuer therapeutischer Möglichkeiten, zum Teil bedingt durch die erhebliche Zunahme der Lues in der Kriegs- und Nachkriegszeit, eine immer größere Bedeutung. Eine exakte titrimetrische Auswertung der Seren, die schon von BOAS, KAUP, GAEHTGENS, KROMAYR und TRINCHOSE, E. MEINICKE, KAHN, PÖHLMANN u. a. gefordert wurde, stand jetzt im Vordergrund des Interesses.

Auf Grund der erheblichen Zunahme unspezifischer Ausfälle in den Lipoidbindungsreaktionen in den

\* Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür ihr auch an dieser Stelle nochmals gedankt sei.

Jahren nach 1940 bemühte man sich, durch eine Verbesserung und Standardisierung der Extrakte zu eindeutigeren Ergebnissen zu gelangen.

1941 isolierte PANGBORN das erste brauchbare, chemisch weitgehend gereinigte Luesantigen *Cardiolipin* aus Rinderherzen. 1949 berichtete UROMA über ein neues Antigen zur Serumdiagnose der Lues, das er aus Weizenkeimlingen gewann. UROMA nannte dieses aus Weizenkeimlingen isolierte Phosphatid *Sitolipin*. Sowohl *Cardiolipin* als auch *Sitolipin* sind nur in Verbindung mit Lecithin und Cholesterin bzw. Tolu balsam in alkoholischer Lösung als Extrakte in den bisher gebräuchlichen Komplementbindungs- und Flockungsreaktionen zu verwenden. Wenn durch die Isolierung der serologisch wirksamen Substanzen auch eine bessere Möglichkeit der Antigenstandardisierung zu erzielen war, und sowohl *Cardiolipin* als auch *Sitolipin* in den Komplementbindungsreaktionen eine größere Spezifität im Vergleich mit ungereinigten Lipoidextrakten zeigten, so erfolgte doch keine grundsätzliche Änderung in der bisherigen serologischen Diagnostik.

Den entscheidenden Wendepunkt in der serologischen Diagnostik der Lues brachte die Entwicklung des *Treponema pallidum*-Immobilisierungstests durch NELSON und MAYER im Jahre 1948. Dieser Test besitzt für die Diagnose der Lues eine ähnlich grundlegende Bedeutung wie das Penicillin für die Therapie. Diese Reaktion, bei der virulente Treponemen als Antigen dienen, kann wohl erstmalig als eine spezifische, routinemäßig durchführbare Antigen-Antikörperreaktion bei Lues angesehen werden. NELSON und MAYER entwickelten eine Nährflüssigkeit (Basalmedium), in der virulente Treponemata pallida über mehrere Tage hinweg beweglich und infektionstüchtig erhalten werden konnten. Auf Grund dieser Arbeiten war es möglich, virulente Treponemen zum Nachweis spezifischer immobilisierender Antikörper in Serum und Liquor zu benutzen.

Die großen technischen Schwierigkeiten dieser Reaktion und die Gefährdung der Untersucher führten dazu, nach Wegen zu suchen, die es gestatteten, mit abgetöteten Treponemata pallida spezifische Antigen-Antikörperreaktionen durchzuführen. HARDY, McLEOD, MAGNUSON u. a. entwickelten mit abgetöteten Treponemen eine *Agglutinationsreaktion*, und NELSON berichtete über eine *Immun-Adhärenzreaktion*. Wir versuchten, mit abgetöteten Treponemata pallida eine *Komplementtiter-* und eine *Komplementbindungsreaktion* auszuarbeiten. Für alle Versuche in dieser Richtung lagen jedoch die größten Schwierigkeiten darin, ausreichende und weitgehend gereinigte Antigenmengen zu gewinnen. NELSON, HARDY und wir benutzten für die Versuche virulente Treponemen, die in Tierpassagen gehalten wurden (NICHOLS).

GAETGENS beschrieb schon 1929 eine Komplementbindungsreaktion mit einer wäßrigen Treponemenaufschwemmung als Antigen. Es gelang ihm, aus Treponemen, die auf künstlichen Nährböden züchtbar waren (REITER), unter Zusatz von Karbol ein wäßriges Antigen zu gewinnen, das sehr sensibel und spezifisch reagierte. Er bezeichnete die von ihm angegebene Komplementbindungsreaktion mit Kulturspirochaetales als „*Pallida*“-*Reaktion*, um hiermit auszudrücken, daß es sich um eine echte Antigen-Antikörperreaktion auf Lues handelt. D'ALESSANDRO, PUCCINELLI u. a. haben sich eingehend mit der Antigenstruktur der Kulturspirochaetales beschäftigt und den — ihrer Meinung nach — spezifischen Charakter dieser Antigen-Antikörperreaktion hervorgehoben.

1948 berichtete ROEMER über eine *Agglutinationsreaktion* bei Lues mit einem Spirochaetenantigen

(REITER). Von zahlreichen Autoren wird immer wieder auf den spezifischen Charakter dieser Komplementbindungs- und Agglutinationsreaktionen mit Kulturspirochaetales hingewiesen. Es wird betont, daß es sich hierbei um Treponemata pallida handelt, die auf Grund zahlreicher Passagen auf künstlichen Nährböden ihre Pathogenität verloren hätten. Die morphologischen Unterschiede zwischen Kulturspirochaetales und pathogenen Treponemata pallida werden mit Mutationen und Veränderungen der Erreger auf Grund jahrelanger Züchtung auf künstlichen Nährböden erklärt. Zum Vergleich für das unterschiedliche Verhalten werden Leptospiren und der BCG-Stamm der Tuberkulose herangezogen.

Wir bemühten uns, auf Grund kritischer Sichtung und Verarbeitung der Literatur sowie eigener experimenteller Versuche die Frage zu klären, ob es sich bei den Kulturspirochaetales um saprophytische Spirochaetales oder um Treponemen handelt, die bis auf morphologische und Pathogenitätsunterschiede mit dem Erreger der Lues identisch sind. Diese Versuche waren für eine Beurteilung und Bewertung spezifischer Antigen-Antikörperreaktionen bei Lues eine notwendige Voraussetzung.

#### *Bisherige Versuche, das Treponema pallidum auf künstlichen Nährböden zu züchten*

1786 glaubte J. HUNTER durch Verimpfung von Trippereiter in Selbstversuchen den Beweis erbracht zu haben, daß Lues und Gonorrhoe dieselbe Krankheit seien. Er glaubte ferner, daß eine Übertragung der Lues auf Tiere nicht möglich wäre. Fast ein ganzes Jahrzehnt haben diese Behauptungen als ein Dogma gegolten. Erst auf Grund der Arbeiten einiger Forscher, die über erfolgreiche Übertragungsversuche auf Tiere berichteten, tauchten Zweifel an der Richtigkeit der Ansichten HUNTERS auf. So beschrieb LANCEROX 1874 gelungene Übertragungen von menschlichem Syphilismaterial auf Kaninchen, KLEBS 1878 auf Affen und HAENSELL 1881 auf Kaninchencornea. Erst 1903 jedoch haben METSCHNIKOFF und ROUX im Institut Pasteur mit Sicherheit typische Ulcera dura nach Inoculation syphilitischen Materials bei Schimpansen und niederen Affen beobachtet. Trotzdem blieben alle ätiologischen Überlegungen im Hinblick auf diese Krankheit bis zur Entdeckung des Erregers der Syphilis durch SCHAUDINN und E. HOFFMANN im Jahre 1905 letztlich Hypothesen.

Schon kurze Zeit nach der Entdeckung des *Treponema pallidum* bemühten sich zahlreiche Forscher, so SCHAUDINN, LEVADITI, WASSERMANN und FICKER, SCHERESCHESKI, NOGUCHI, KROO, W. H. HOFFMANN u. v. a., den Erreger der Syphilis auf künstlichen Nährböden in Reinkultur zu züchten. Bei allen Züchtungsversuchen des *Treponema pallidum* sind bisher zwei grundsätzlich verschiedene Wege beschritten worden. Der größere Teil der Forscher benutzte als Ausgangsmaterial Primäraffekte, Sekundärpapeln, zumindest aber Effloreszenzen florider Lues, in denen mit größter Wahrscheinlichkeit neben dem *Treponema pallidum* noch andere Mikroorganismen vorhanden waren. Man ging also, mehr oder weniger bewußt, von Mischkulturen aus, und versuchte dann, durch Passagen auf halbstarren oder festen Kulturmedien zu einer Trennung der verschiedenen Mikroorganismen und damit zu einer

Isolierung des *Treponema pallidum* zu gelangen. Da die Erfahrung gelehrt hat, daß die Anpassungsfähigkeit pathogener Mikroorganismen an künstliche Nährböden meist geringer ist als die apathogener Keime, war es von vornherein ein besonders schwieriges Unterfangen, die viel anspruchsloseren saprophytischen Spirochaetales von den hochempfindlichen, virulenten *Treponemata pallida* zu trennen. Der zweite und vielleicht aussichtsreichere Versuch ging davon aus, für die Kultur möglichst reine, d. h. nur *Treponema pallidum* enthaltende Gewebsstücke oder Organflüssigkeiten als Ausgangsmaterial zu verwenden. Hierzu benutzte man vor allem Liquores von Luikern oder Hoden syphilitischer Kaninchen, die unter streng aseptischen Kautelen exstirpiert wurden. Inguinale Drüsen als reines Ausgangsmaterial zu benutzen, gilt auch heute noch als fragwürdig, da in zahlreichen Fällen in diesem Gewebe andere Mikroorganismen, z. B. saprophytische Genitalspirochaetales, nachgewiesen wurden.

Für das Gelingen einer Züchtung der Treponemen auf künstlichen Nährböden war es wichtig, Kenntnis über die Lebensbedingungen dieser Mikroorganismen zu erhalten. Schon 1906 wies E. HOFFMANN darauf hin, daß das *Treponema pallidum* vor allem wegen seines üppigen Wachstums in mazerierten Fetten und der großen Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff sicherlich ein anaerober Parasit wäre. Man hat sich ganz allgemein dieser Ansicht angeschlossen und ist auch heute der Meinung, daß das *Treponema pallidum* ein strikter Anaerobier ist. Die gute Vermehrung der Treponemen in Kaninchenhoden und Lebern syphilitischer Fetten im Gegensatz zu flüssigen Medien, wie Blut, Liquor usw., erhöhte die Wahrscheinlichkeit, daß nach Zugabe von Gewebsstücken zu halbstarren oder flüssigen Nährböden ein besseres Überleben des *Treponema pallidum* zu erwarten wäre.

Es ist naturgemäß sehr schwierig, diejenigen chemischen und physikalischen Bedingungen herauszufinden, unter denen *Treponemata pallida* auf künstlichen Nährböden gedeihen können. BRAUN wies wiederholt darauf hin, daß die üblichen, Pepton-Fleischwasser und andere animalische Stoffe enthaltenden Nährböden in chemischer Hinsicht außerordentlich kompliziert und in ihrer Zusammensetzung nicht konstant sind. Die von ihm geforderte Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels von Mikroorganismen ist bei den *Treponemata pallida* sehr schwer durchzuführen, da diese Mikroorganismen nicht mit Sicherheit eine Vermehrung auf künstlichen Nährböden zeigen.

Da die ersten Versuche der Züchtung virulenter Treponemen auf künstlichen Nährböden erfolglos verliefen, bemühte man sich schon sehr bald, zunächst einen brauchbaren Nährboden für saprophytische Spirochaetales zu entwickeln.

Es gelang MÜHLENS 1906, das *Treponema dentium* nach einer Methode von ELLERMANN auf Pferdeserumagar (1:3) in hoher Schicht, anfangs mit einem Begleitbakterium, und später in Reinkultur zu züchten. Eine Trennung der saprophytischen Mundspirochaetales in *Treponema microdentium* und *macrodentium* führte MÜHLENS noch nicht durch. Zahlreiche Forscher versuchten, mit dieser Methode auch das *Treponema pallidum* zu züchten. Positive Ergebnisse der Kulturversuche auf diesem Nährboden mit *Treponema pallidum* wurden jedoch vorerst nicht berichtet. VOLPINO und FONTANA brachten excidierte Papelstückchen in einen Nährboden, der Blut bzw. Serum enthielt und beobachteten eine Vermehrung des Trepo-

nema pallidum. Gleichzeitig entwickelte sich eine starke Mischkultur, und es kam zu einer Überwucherung der Treponemen auf den frischen Gewebsstücken mit anderen Mikroorganismen. EITNER konnte auf Grund seiner Nachuntersuchungen die von VOLPINO und FONTANA beobachtete Vermehrung der Treponemen nicht bestätigen.

LEVADITI und MCINTOSH verbrachten Reizserum eines Affenprimäraffektes, das zahlreiche *Treponemata pallida* enthielt, in Kollodiumsäckchen, die mit menschlichem und tierischem Serum gefüllt waren, das zuvor  $\frac{1}{2}$  Std auf 60° C erhitzt worden war. Die Kollodiumsäckchen wurden in die Bauchhöhle von Affen verbracht und die Tiere gleichzeitig am oberen Lidrand mit Material aus einem Primäraffekt geimpft. Nach 23 Tagen trat am oberen Lidrand ein Primäraffekt auf. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Inhalt der Kollodiumsäckchen untersucht. Neben Bakterien fanden sich zahlreiche Spirochaetales, die nach Angaben von LEVADITI morphologisch mit *Treponemata pallida* übereinstimmten. Übertragungsversuche mit dem Inhalt dieser Kollodiumsäckchen auf Affen gelangen nicht. MÜHLENS und LÖHE führten Nachuntersuchungen durch, konnten jedoch die Befunde von LEVADITI nicht bestätigen.

In weiteren Versuchen zur Züchtung des *Treponema pallidum* benutzte MÜHLENS flüssige und feste Nährböden, und zwar Bouillon aus Affen- oder Kaninchenlebern, unter Zusatz von Pferde- bzw. Affenserum, Agar und Pferdeserum (2:1), Placentaagar (nach KUTSCHER) mit oder ohne Traubenzucker, mit Pepton und verschiedenen Serumarten. Die Resultate der sehr zahlreich durchgeführten Versuche bezüglich einer Züchtung des *Treponema pallidum* waren negativ. 1909 berichtete MÜHLENS erstmalig, daß es ihm gelungen sei, Spirochaeten zu züchten, die im Aussehen von dem *Treponema pallidum* nicht zu unterscheiden waren. Der Nährboden bestand aus einem 3%igen, schwach alkalischen Agar und Pferdeserum. Zuerst erhielt MÜHLENS Mischkulturen, die er jedoch nach und nach reinigen konnte. Alle Kulturen waren von einem üblen Geruch begleitet, so daß die Vermutung nahelag, daß es sich hierbei um *Treponemata microdentia* gehandelt haben könnte. MÜHLENS weist selbst darauf hin, daß seine Kulturspirochaetales sich in bezug auf das Wachstum ähnlich verhalten hätten wie das *Treponema dentium*. Auch W. H. HOFFMANN, der die Arbeiten von MÜHLENS fortführte, kam zu gleichen Ergebnissen und stellte neben einer Verflüssigung des Nährbodens in allen Fällen einen üblen Geruch fest.

SCHERESCHEWSKI, der sich von 1907—1913 sehr eingehend mit der Züchtung des *Treponema pallidum* beschäftigt hatte, berichtete 1909, daß es ihm gelungen wäre, Treponemen auf künstlichen Nährböden zu züchten, daß er jedoch von der Identität der Mikroorganismen mit dem Erreger der Syphilis nicht überzeugt wäre. SCHERESCHEWSKI gab wörtlich an:

„1. Es gelingt wohl, aus syphilitischem Material Spirochaetales zu züchten, die mikroskopisch auf keine Weise von dem echten *Treponema pallidum* zu unterscheiden sind.

2. Es ist weder durch Agglutination, Präzipitation, noch durch den Komplementbindungsversuch gelungen, spezifische Beziehungen zwischen den Kulturspirochaetales und Luikerseren nachzuweisen.

3. Versuche einer Kutireaktion waren erfolglos.

4. Die gezüchteten Spirochaetales waren nicht tierpathogen.“

1912 und 1913 glaubte SCHERESCHEWSKI jedoch, daß es ihm gelungen sei, die Züchtung des *Treponema pallidum* auf künstlichen Nährböden durchzuführen. Er gab an, daß auf Grund positiver Tierversuche der Beweis für die Identität der von ihm gezüchteten Kulturspirochaetales mit dem *Treponema pallidum* vorläge. 1914 beschrieb er diese Tierversuche.

Eine Reinkultur der 7. Passage wurde auf ein Kaninchen übertragen. Die Injektion erfolgte am oberen Pol des Hodens. Nach 41 Tagen war eine Ulceration zu beobachten. SCHERESCHEWSKI hielt es für möglich, daß im verimpften Material noch *Treponemata pallida* von der syphilitischen Papel, die er als Ausgangsmaterial benutzt hatte, vorhanden waren. Bei einem weiteren Versuch wurde eine Reinkultur in das Scrotum

eines Kaninchens gespritzt und in die Cornea eingerieben. Im Scrotum konnten keine Veränderungen festgestellt werden, an der Cornea beobachtete SCHERESCHEWSKI eine Keratitis parenchymatosa ohne Vascularisation. Die Kulturen von SCHERESCHEWSKI wuchsen ohne den üblen Geruch, den MÜHLENS und W. H. HOFFMANN bei ihren Kulturversuchen festgestellt hatten.

Nach den Untersuchungen von NOGUCHI wachsen auch *saprophytische Spirochaetales*, die dem *Treponema pallidum* ähnlich sind, ohne Geruch, so z. B. das *Treponema macrodentium*, *Treponema calligyrum* und *Treponema genitale*.

Auch TOMASCZEWSKI berichtete 1912 über Erfolge bei der Züchtung des *Treponema pallidum*. In Tierversuchen, die er mit Mischkulturen durchführte, ist es ihm nach seinen Angaben gelungen, syphilitische Erscheinungen beim Kaninchen zu erzeugen. Es bleibt jedoch auch hier die Frage offen, inwieweit in den Mischkulturen noch infektionstüchtige Erreger aus dem Ausgangsmaterial enthalten waren. Auffallend ist, daß es ihm nicht gelang, die Erreger in Tierpassagen weiterzuimpfen.

SHAMINE berichtete ebenfalls über positive Züchtungsversuche, bei denen er von Mischkulturen ausgegangen war. Bei der Übertragung auf Kaninchen war er sich nicht völlig sicher, ob die Infektion angekommen war. Die Kulturen wuchsen geruchlos. SOVADE berichtete 1911, daß es ihm gelungen sei, mit Mischkulturen durch intrakardiale Injektionen bei Kaninchen eine Syphilis zu erzeugen. SOVADE meinte jedoch, daß die gelungene Übertragung von der Kultur auf das Kaninchen möglicherweise durch noch überlebende *Treponemata pallida* aus dem Ausgangsmaterial erfolgt sein könnte. SOVADE benutzte für seine Impfungen Mischkulturen in 1.—3. Passage. In allen Kulturen wuchsen die *Treponemen* mit einem üblen Geruch.

Die von STERZI und STANDACHER unternommenen Versuche, das *Treponema pallidum* auf die Chorionallantois-Membran von Hühnerembryonen zu verimpfen, gelangen nicht. Virulente *Treponemata pallida* waren nicht länger als 4 Std bei 37° C beweglich, und es konnten nach dieser Zeit auch keine Infektionen bei Kaninchen erzeugt werden. WILE und SNOW führten ähnliche Versuche durch und sahen ein Überleben einer geringen Anzahl von Organismen in Hühnerembryonen, die 8 Tage lang bei 35° C gehalten wurden. Bei einer Kontrolle dieser Überimpfungsversuche auf Hühnerembryonen bei 37° und 37,5° C kamen sie zu ähnlichen Ergebnissen wie STERZI und STANDACHER.

Von besonderem Interesse für unsere Untersuchungen sind die Kulturen, die WASSERMANN und FICKER auf künstlichen Nährböden anlegten, und die später von REITER fortgezüchtet wurden. Als Ausgangsmaterial benutzten WASSERMANN und FICKER Primäraffekte. In allen Fällen handelte es sich also um Mischkulturen, von denen sie nach und nach zu Reinkulturen gelangten. Es gelang ihnen, aus dem Material von 80—90 Primäraffekten 7 Reinkulturen zu gewinnen. Sie bezeichneten die Kultur B 36 als besonders rein und gaben an, daß es ihnen gelungen sei, beim Kaninchen nach Überimpfung mit dieser Kultur syphilitische Erscheinungen zu erzeugen. Dieser Stamm ließ sich auch nach den Angaben der Autoren von Tier zu Tier fortzüchten. Auch eine gelungene Rückimpfung vom Kaninchen auf den künstlichen Nährboden gab FICKER an. Die Kulturen wuchsen ohne Geruch.

REITER bemühte sich, optimale Nährböden zu finden, auf denen er anfangs vor allem *saprophytische Spirochaetales* aus der Mundhöhle züchtete. Später

benutzte er diese Nährböden, um die von WASSERMANN und FICKER isolierten Stämme weiter in Passagen zu züchten. Die Reinkulturen von *saprophytischen Spirochaetales* hatten nach seinen Angaben einen aromatischen, nicht unangenehmen Geruch.

Als Nährmedium benutzte er unter anderem normales Kaninchenserum, das mit einer 1%igen Normosallösung gemischt war, und in das Meerschweinchen- oder Kaninchengehirnstücke eingeführt wurden. Das Nährmedium wurde 24 Std auf 56° C erwärmt und anschließend auf Sterilität geprüft. Die Beimpfung geschah mittels Capillaren und anschließender Überschichtung mit sterilem Paraffinöl oder weißer Vaseline. Die Kulturen wurden bei 37° C bebrütet und ein Wachstumsoptimum nach 4 Tagen erzielt. Die Kulturen mit *Spirochaetales* blieben nach Angaben REITERS klar und geruchlos.

Außer den angeführten Autoren haben noch zahlreiche weitere Forscher, so ARISTOWSKY, HOLTZER, KROO, ZINSSER u. a. versucht, virulente *Treponemata pallida* auf künstlichen Nährböden zu züchten. Fast immer ging man hierbei von Mischkulturen aus.

Besondere Beachtung verdienen die eingehenden und sorgfältigen Versuche von NOGUCHI. Es gelang ihm, zahlreiche *saprophytische Genitalspirochaetales* in Reinkultur zu züchten und durch kulturelle und serologische Unterscheidungsmerkmale zu einer Trennung der verschiedenen Arten zu gelangen. Es ist sein Verdienst, die Systematik der *Spirochaetales*, insbesondere der *saprophytischen Genitalspirochaetales*, aufgestellt zu haben. Er bemühte sich auch, das *Treponema pallidum* in Reinkultur auf künstlichen Nährböden zu züchten. Er benutzte hierzu in erster Linie *Treponemata pallida*, die er aus Kaninchenhoden gewonnen hatte. Es verwundert jedoch, wenn er schreibt, daß die *Treponemen* in der ersten Passage gemeinsam mit anderen Bakterien wuchsen. Es ist daraus zu schließen, daß entweder die *Treponemen*-stämme, die in Kaninchenpassagen gehalten wurden, nicht rein waren, oder daß bei der Überimpfung eine Verunreinigung mit anderen Mikroorganismen eingetreten war. NOGUCHI prüfte zahlreiche Kulturmedien und stellte fest, daß reines Kaninchenplasma und Pferdeserum, Serumwasser, Serumagar allein nicht zur Kultivierung des *Treponema pallidum* geeignet sind.

Er führte die Züchtungsversuche unter streng anaeroben Bedingungen durch und fand als geeigneten Nährboden Serumwasser, und zwar 1 Teil Serum und 3 Teile Wasser, mit einem Zusatz von großen Stücken frischer Niere oder Hoden gesunder Kaninchen. Er benutzte Röhren von 20 cm Länge und 1,5 cm Breite, in die er zuerst frisches Gewebe hineingab und dann bis 15 cm mit Serumwasser auffüllte. Er überschichtete das Nährmedium anschließend mit Paraffinöl in 3 cm Höhe. Die Röhren wurden nach Beimpfung durch Einleiten von Wasserstoff mit dem KIPPSchen Apparat von Sauerstoff befreit. Dann setzte er die Röhren in eine Anaerobierglocke, deren Boden mit Pyrogallolsäurelösung bedeckt war. Der ganze Apparat wurde anschließend verschlossen und nach ausreichendem Vakuum eine konzentrierte sauerstofffreie Kalilösung zugesetzt (Kontrolle zum Nachweis von O<sub>2</sub>-Spuren im Anaerostaten). Nach nochmaliger Durchleitung von Wasserstoff wurde der Apparat durch Unterdruck geschlossen und in den Brutschrank gestellt. Die Kulturröhren wurden erst nach 2 Wochen geöffnet, da sich nach den Erfahrungen von NOGUCHI eine frühere Kontrolle schädigend auf das Wachstum der Mikroorganismen auswirkte.

NOGUCHI gab an, daß es ihm mit diesem Verfahren gelungen sei, 6 *Treponema pallidum*-Stämme und 1 *Treponema pertenuis*-Stamm in Reinkultur zu züchten. Da auch seine Kultur in der ersten Passage mit anderen Bakterien in Mischkultur wuchs, benutzte

er zur Trennung der Begleitbakterien von den Kulturspirochaetales ein Berkefeld-Filter. Er gab an, daß das Berkefeldfilter die Spirochaetales zwar nicht direkt passieren läßt, daß jedoch bei einer Kultur im Berkefeldfilter nach 5 Tagen ein Durchtritt der Treponemen zu beobachten wäre. Die Pathogenität der Kulturspirochaetales prüfte er durch Überimpfung auf Kaninchen. Bei 2 von 8 Kaninchen, die er mit einem Kulturstamm impfte, und bei 3 von 4 Kaninchen, die er mit einem 2. Stamm impfte, konnte er eine syphilitische Orchitis mit einem großen Reichtum an Treponemen feststellen. Es ist aus der Arbeit von NOGUCHI nicht zu ersehen, welche Kulturpassage er für seine Pathogenitätsprüfung benutzt hat. Nach den Angaben von NOGUCHI sind folgende Punkte für die Züchtung virulenter *Treponemata pallida* auf künstlichen Nährböden zu beachten:

1. die Gegenwart von sterilem, frischem Gewebe im Kulturmedium,
2. vollkommene Anaerobie,
3. eine leicht alkalische Reaktion des Nährmediums,
4. Temperaturen von 35—37° C.

Die Kulturen von NOGUCHI wuchsen immer ohne Geruch und nur bei Zusatz von frischem Gewebe.

NOGUCHI schickte seine Kulturen an ROUX und LEVADITI im Institut PASTEUR. LEVADITI und DANULESCO haben diese Kulturen eingehend untersucht und geäußert, daß es sich um *saprophytische Spirochaetales* handelt, und zwar um die von LEVADITI als *Spirochaeta gracilis* bezeichnete Art. JAHNEL untersuchte zu einem späteren Zeitpunkt die Kulturen von NOGUCHI und fand, daß sie zwar auf dem von REITER angegebenen Nährboden nicht züchtbar waren, jedoch nach seiner Meinung auch in die Gruppe der saprophytischen Genitalspirochaetales gehörten.

Die wichtigsten Nachuntersuchungen über die Kulturspirochaetales führten in Amerika KAST und KOLMER, und in Deutschland JAHNEL durch. Sowohl KAST und KOLMER als auch JAHNEL züchteten selbst saprophytische Spirochaetales, um Vergleichsmöglichkeiten mit den angeblichen *Treponemata pallida* auf künstlichen Nährböden zu besitzen. KAST und KOLMER gingen so weit, daß sie einzelnen Kulturmedien auch Bakterien zusetzten, um die Möglichkeit einer Begünstigung des Wachstums virulenter *Treponemata pallida* durch Bakterien in ihre Versuche einzuschließen. Sie benutzten als Ausgangsmaterial syphilitische Papeln und *Treponemata pallida* aus Kaninchenhoden (NICHOLS) und kamen zu dem Schluß, daß „no true multiplication of Spirochaetales occurred in any of the media“. KAST und KOLMER wiesen darauf hin, daß die Spirochaetaleskulturen von REITER nicht dieselben sind, wie die von NOGUCHI, da die Kulturen von NOGUCHI nicht auf den Nährböden wachsen, die REITER angegeben hat.

JAHNEL berichtete 1934, daß es ihm nicht gelungen sei, das *Treponema pallidum* auf irgendeinem der in der Literatur angegebenen Kulturmedien zu züchten. JAHNEL ließ sich die verschiedenen angeblichen *Treponema pallidum*-Kulturen schicken, so die von WASSERMANN und FICKER, KROO, ARISTOWSKY, NOGUCHI, REITER, KOLMER, ZINSSER u. a. Es gelang ihm ohne Schwierigkeiten, die Kulturspirochaetales in weiteren Passagen zu erhalten. Er stellte fest, daß sämtliche Kulturspirochaetales in morphologischer, biologischer und biochemischer Hinsicht unterschied-

liche Merkmale gegenüber dem *Treponema pallidum* besaßen, daß sie jedoch in diesen 3 Merkmalen eine enge Verwandtschaft mit den von ihm gezüchteten saprophytischen Spirochaetales zeigten.

### Eigene Züchtungsversuche

Wir verwendeten für unsere Versuche ausschließlich *Treponemata pallida* (NICHOLS), die wir aus Kaninchenhoden spätestens 8 Tage nach der Inoculation gewonnen hatten. Mit einer Treponemenaufschwemmung in physiologischer NaCl-Lösung mit einem Gehalt von 20% inaktivierten Kaninchen-serums wurden Übertragungsversuche auf künstliche Nährböden vorgenommen. Die zuerst benutzten Nährböden waren nach den Angaben von REITER in folgender Weise hergestellt.

125 g frische Rinderleber wurde von Haut und Fett befreit und in 400 cm<sup>3</sup> Quellwasser  $\frac{3}{4}$  Std lang im Dampftopf gekocht. Anschließend wurde die Leber herausgenommen, abgespült und 1 Std im Heißluftschrank bei 150° C getrocknet. Die Leberbrühe wurde filtriert, mit 1% Pepton und 0,5% NaCl versetzt und eine weitere halbe Stunde im Dampftopf gekocht. Mit einer 10%igen Sodalösung wurde der pH-Wert auf 8,0 eingestellt. Nach einer weiteren halben Stunde Dampftopf wurde die Brühe durch ein doppeltes Papierfilter filtriert und anschließend mit 2% Traubenzucker versetzt. Die Leber wurde in kleine Stücke geschnitten und je 2—3 dieser Stücke in Röhren von 8 cm Länge und 1 cm Weite verbracht. Die Röhren wurden daraufhin 20 min bei 120° C autoklaviert und sodann mit Leberbouillon aufgefüllt. Die Nährflüssigkeit wurde mit 3 mm sterilem Paraffinöl überschichtet und die Röhren mit einem Gummistopfen verschlossen. Abschließend wurden die Röhren an 2 aufeinanderfolgenden Tagen für 1 Std in den Dampftopf gegeben.

Es gelang uns trotz zahlreicher, sich über mehrere Monate erstreckende Wiederholungen unserer Versuche in keinem Fall, ein Wachstum virulenter Treponemen nach der Überimpfung auf den Reiter-Nährböden zu erzielen. Die gleichzeitig zur Kontrolle überimpften saprophytischen Spirochaetales gediehen auf diesen Nährböden sehr gut und zeigten zwischen dem 5. und 7. Tag ihr Wachstumsoptimum. Um die anaeroben Bedingungen der Nährflüssigkeit zu verbessern, setzten wir dem oben beschriebenen Nährboden 120 mg Natriumthioglykolat je 100 cm<sup>3</sup> Nährbodenflüssigkeit zu. Auch bei dieser Versuchsanordnung konnten wir kein Wachstum virulenter Treponemen beobachten. In einem weiteren Versuch fügten wir alle Substanzen, die im Basalmedium von NELSON und MAYER enthalten sind, dem Reiter-Nährboden hinzu, und zwar:

|                                            |                           |
|--------------------------------------------|---------------------------|
| Rinderalbumin . . . . .                    | 2,00 g                    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . . | 0,36 g                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .  | 0,05 g                    |
| Natriumpyruvat . . . . .                   | 0,01 g                    |
| Natriumthioglykolat . . . . .              | 0,12 g                    |
| Glutathion . . . . .                       | 0,03 g                    |
| Cysteinhydrochlorid . . . . .              | 0,02 g                    |
| Natriumbicarbonat . . . . .                | 0,06 g                    |
| Rinderserum-Ultrafiltrat . . . . .         | 5,00 cm <sup>3</sup>      |
| Reiter-Nährbodenflüssigkeit . . . . .      | ad 100,00 cm <sup>3</sup> |

Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

Auch auf diesem Nährboden gelang es uns nicht, virulente Treponemen zu züchten. Wir benutzten für das zuletzt angegebene Nährmedium zuerst Aqua bidest. und später ausschließlich Quellwasser, da es sich bei Kontrollen gezeigt hatte, daß die Anzahl der beweglichen Treponemen bei Benutzung von Quellwasser nach 48 Std um 30% höher lag als bei der Anwendung von Aqua bidest. Auch auf Grund unserer

eigenen Versuche mußten wir feststellen, daß eine Züchtung virulenter *Treponemata pallida* auf dem von REITER angegebenen Nährboden und Modifikationen der Nährflüssigkeit nicht gelang. Die Kulturspirochaetales Reiter zeigten jedoch ein üppiges Wachstum auf diesen Nährböden. Ein Geruch dieser Spirochaetales auf den verschiedenen Nährböden wurde nicht festgestellt. Wir führten alle Versuche unter streng anaeroben Bedingungen durch und verwendeten außer reduzierenden Substanzen in den Nährböden Anaerostaten zur Aufnahme der Kulturröhrchen. Die Anaerostaten wurden nach der Beschickung mit den Kulturröhrchen mehrmals evakuiert und ein Gemisch von 95% Stickstoff und 5% CO<sub>2</sub> eingeleitet. Die Bebrütung erfolgte im Brutschrank bei 35° C.

#### Diskussion

Es ist nicht leicht, aus der Vielzahl der sich zum Teil widersprechenden Angaben in der Literatur ein klares Bild zu gewinnen, ob die Züchtung des *Treponema pallidum* auf künstlichen Nährböden wirklich gelungen ist. Nach den Versuchen von KAST und KOLMER, JAHNEL und unseren eigenen Erfahrungen kann der Erfolg einer Kultivierung virulenter *Treponemata pallida* in vitro nicht bestätigt werden. Der größte Teil der Forscher stand vor der schwierigen Aufgabe, das *Treponema pallidum* erst aus einer Mischkultur zu isolieren. Es lag die Gefahr nahe, daß durch die Mutationsmöglichkeiten aller Mikroorganismen auf künstlichen Nährböden apathogene, saprophytische Genitalspirochaetales in Kulturpassagen in ihrer Morphologie *Treponema pallidum*-ähnliche Formen zeigen konnten. Es lag jedoch auch im Bereich der Möglichkeit, daß *Treponemata pallida* ihrerseits durch Mutation auf künstlichen Nährböden Formen hervorbringen konnten, die der Morphologie saprophytischer Spirochaetales ähneln.

Ein wichtiger Punkt ist bei der Reinzüchtung des *Treponema pallidum* auf künstlichen Nährböden meistens außer acht gelassen worden, und zwar die Anwesenheit von Antikörpern im Ausgangsmaterial. Über die spezifische Natur der Antikörper besteht heute kein Zweifel mehr, und wir wissen, daß sie zu einer Immobilisierung der Treponemen mit folgender Lysis bei Anwesenheit von Komplement führen. So scheint uns sowohl für Tierpassagen als auch für den Übergang von menschlichem Material auf Versuchstiere, ebenso wie für den Übergang von menschlichem oder tierischem Material auf künstliche Nährböden gerade dieser Punkt von besonderer Bedeutung zu sein. Immobilisiert werden durch diese Antikörper allerdings nicht die saprophytischen Genitalspirochaetales, sondern ausschließlich *Treponemata pallida*. Bis auf die Arbeiten von NOGUCHI fanden wir bei keinem Autor, der über gelungene Kulturversuche mit *Treponema pallidum* berichtete, Angaben darüber, daß als Ausgangsmaterial zur Züchtung auf künstlichen Nährböden mit Sicherheit ausschließlich Reinkulturen virulenter *Treponemata pallida* benutzt wurden. Es verwundert, daß NOGUCHI in der 1. Passage seiner Kulturen neben *Treponema pallidum* noch andere Mikroorganismen vorfand, obwohl er mit größter Wahrscheinlichkeit von Reinkulturen ausging. Wir haben bei unseren Versuchen, bei denen wir als Ausgangsmaterial *Treponemata pallida* (NICHOLS) benutzten, die in Reinkulturen in Kaninchenhoden vor-

handen waren und zu einem Zeitpunkt gewonnen wurden, zu dem noch keine tiereigenen immobilisierenden Antikörper nachweisbar waren, bei der Überimpfung auf künstliche Nährböden in den meisten Fällen keinerlei Vermehrung irgendwelcher Mikroorganismen beobachten können. Wir stellten lediglich nach einigen Tagen fest, daß in den modifizierten Nährböden noch gut bewegliche *Treponemata pallida* vorhanden waren. In einigen wenigen Röhrchen der gleichen Versuchsreihe sahen wir allerdings Staphylokokken, in anderen bewegliche Stäbchen, und konnten die Anwesenheit dieser Mikroorganismen auf Verunreinigung während der Überimpfung zurückführen. Es scheint uns deshalb die Verwendung eines reinen Ausgangsmaterials, wie es von KAST und KOLMER, JAHNEL und auch uns benutzt wurde, für die Frage der Bewertung der Züchtungserfolge von vordringlicher Bedeutung zu sein.

Einige der Autoren, die über gelungene Züchtungsversuche des *Treponema pallidum* berichten, räumen ein, daß die Erreger auf künstlichen Nährböden ihre Pathogenität verloren hätten. So wies schon LEVADITI darauf hin, daß die Kulturen in den Kollodiumsäckchen nicht mehr tierpathogen waren. Auch die Kulturspirochaetales Reiter zeigten keine Pathogenität bei für Syphilis empfänglichen Tieren, wie wir selbst in eigenen zahlreichen Versuchen nachweisen konnten. JAHNEL verneinte die Möglichkeit, daß der Lueserreger im Kulturmedium seine Pathogenität gänzlich verlieren könnte und wies darauf hin, daß zwar auf künstlichen Nährböden auch bei anderen Krankheitserregern eine Virulenzminderung eintreten könnte, daß jedoch nach mehreren Tierpassagen fast immer eine Virulenzsteigerung zu beobachten wäre.

NOGUCHI, SHAMINE, WASSERMANN und FICKER, SCHERESCHESKI, MÜHLENS, W. H. HOFFMANN u. a. führten für den Beweis des Gelingens ihrer Kulturversuche mit dem *Treponema pallidum* in erster Linie an, daß es — ausgehend von diesen Kulturen — möglich war, bei Kaninchen oder Affen Syphilis zu erzeugen. In dem Basalmedium, das NELSON und MAYER angegeben haben, können noch nach 8 bis 12 Tagen bewegliche, infektiösaufreife *Treponemata pallida* nachgewiesen werden. Die von NOGUCHI u. a. benutzten Nährböden standen dem Basalmedium von NELSON und MAYER in bezug auf günstige Milieubedingungen für das *Treponema pallidum* kaum nach, so daß ohne weiteres an die Möglichkeit gedacht werden muß, daß mit den apathogenen, saprophytischen Kulturspirochaetales, die sich auf diesen Nährböden vermehrten, auch einzelne *Treponemata pallida* auf die Tiere überimpft wurden. Der verhältnismäßig lange Zeitraum (30—40 Tage), der nach der Impfung der Tiere mit massenhaftem Spirochaetalesmaterial bis zum Auftreten syphilitischer Erscheinungen (Orchitis, Primäraffekt) verstrich, deutet darauf hin, daß die Mehrzahl der überimpften Mikroorganismen sicherlich nicht *Treponemata pallida* waren. Wir haben bei unseren Versuchen bei mehr als 200 Tieren niemals beobachtet, daß eine Orchitis zu einem späteren Zeitpunkt als längstens 21 Tage nach der Inoculation auftrat. In den meisten Fällen begann die Orchitis zwischen dem 7. und 10. Tag und zwar dann, wenn mehr als 8 Treponemen je Blickfeld im Ausgangsmaterial vorhanden waren.

In einer weiteren Arbeit werden wir auf Grund eigener tierexperimenteller und serologischer Versuche zur Frage Stellung nehmen, ob mit *Kulturspirochaetales* (REITER) spezifische oder für *Lues* charakteristische Antigen-Antikörperreaktionen durchzuführen sind.

**Zusammenfassung.** Es werden Züchtungsversuche des Lueserregers auf künstlichen Nährböden kritisch besprochen. Auf Grund der Versuche von KAST und KOLMER, JAHNEL und unserer eigenen experimentellen Erfahrungen, über die im einzelnen berichtet wird, kann die erfolgreiche Züchtung virulenter *Treponemata pallida* auf künstlichen Nährböden nicht bestätigt werden. Es wird darauf hingewiesen, daß fast alle Forscher, die über positive Züchtungsversuche auf künstlichen Nährböden berichteten, von Mischkulturen ausgingen, und daß hierdurch die Wahrscheinlichkeit einer Kultivierung saprophytischer *Spirochaetales* größer war als die einer Züchtung der hochempfindlichen, virulenten *Treponemata pallida*.

**Literatur.** ARISTOWSKY, W., u. R. HOLTZER: Klin. Wschr. 1925, 2016. — BOAS, H.: Die Wassermann-Reaktion usw. Berlin: S. Karger 1922. — BRAUN, H.: Med. Wschr. 1953, 293. — D'ALLESSANDRO, G., u. V. A. PUCCINELLI: Giorn. med. Italia 1, 68 (1944). — EITNER, E.: Münch. med. Wschr. 1907, 770. — ELLERMANN: Zit. P. MÜHLENS, Dtsch. med. Wschr. 1907, 1261. — GAERTGENS, W.: Med. Klin. 1929, 390. — HAENSELL, P.: Arch. vergl. Ophthalm. 27, 93 (1881). — HARDY, K.: Zit. BRUCK, Serodiagnose S. 318. 1924. — HOFFMANN, E.: Dtsch. med. Wschr. 1905, 43. — Dermat. Z. 13, 221, 561 (1905/06). — Münch. med. Wschr. 1911, 1769. — HOFFMANN, W. H.: Z. Hyg. 68, 27 (1911). — Berl. klin. Wschr. 1911, 60. — HUNTER, J.: Zit. in JADASSOHN'S Handbuch, Bd. XV/1, S. 167. 1927. — JAHNEL, F.: Klin. Wschr. 1934, 550. — KAHN, R. L.: Arch. of Dermat. 5, 570 (1922). — KAST, C. C., and J. A. KOLMER: Amer. J. Syph. 32, 421 (1929). — KAUP, J.: Kritik der Methodik der Wassermann-

Reaktion usw. Arch. f. Hyg. 87, 1 (1918). — KLEBS, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. Leipzig 1879. — KROMAYER, H., u. F. TRINCHESE: Med. Klin. 1912, 404. — KROO, H.: Zit. KOLLE-HETSCH S. 502. 1952. — LEVADITI, C., et J. DANULESCO: C. r. Soc. Biol. Paris 73, 256 (1912). — LEVADITI, C., A. MARIE et NICOLAU: C. r. Acad. Sci. Paris 172, 1542 (1921). — LEVADITI, C., et MCINTOSH: Ann. Inst. Pasteur 21, 784 (1907). — McLEOD, C. H., and J. H. MAGNUSON: J. Ven. Dis. Inform. 32, 274 (1951). — Amer. J. Syph. 37, 9 (1953). — MEINICKE, E.: Klin. Wschr. 1929, 1080. — Dtsch. med. Wschr. 1937, 1040. — METSCHNIKOFF, E., et P. ROUX: Ann. Inst. Pasteur 1903, 809. — MÜHLENS, P.: Z. Hyg. 57, 405 (1907). — Klin. Jb. 23, 339 (1910). — MÜHLENS, P., u. LÖHE: Zbl. Bakter. I Orig. 47 (1908). — NELSON, R. A., and M. MAYER: J. of Exper. Med. 89, 369 (1949). — NOGUCHI, H.: J. of Exper. Med. 14, 99 (1911); 15, 90, 201 (1912); 16, 194 (1912); 17, 96 (1913); 27, 671 (1918). — Münch. med. Wschr. 1911; 1913. — Berl. klin. Wschr. 1912. — Z. Immun.forsch. 14 (1912). — Ann. Inst. Pasteur 30, 1 (1916). — J. Amer. Med. Assoc. 77, 2052 (1921). — PANGBORN, M.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 1941, 48. — J. of Biol. Chem. 137, 545 (1941); 143, 247 (1941); 153, 343 (1944). — Acta dermat.-vener. (Stockh.) 24, 152 (1952). — PÖHLMANN, A.: Arch. of Dermat. 5, 570 (1922). — REITER, H.: Klin. Wschr. 1926, 444. — ROEMER, G.: Klin. Wschr. 1948, 574. — SCHAUDINN, F., u. E. HOFFMANN: Arb. ksl. Gesdh.amt 22, 528 (1905). — Berl. klin. Wschr. 1905, 673. — Dtsch. med. Wschr. 1909, 29; 1913, 1408. — SCHERESCHEWSKI, J.: Dtsch. med. Wschr. 1909, 1260; 1912, 1355; 1913, 1408. — Berl. klin. Wschr. 1920, 1142. — SHAMINE, T.: Zbl. Bakter. I Orig. 65 (1912). — SOWADE, H.: Dtsch. med. Wschr. 1911, 1934. — Arch. f. Dermat. 114, 247 (1913). — TOMASCZEWSKI, E.: Berl. klin. Wschr. 1912, 1556. — UROMA, E., u. M. TUOMIOJA: Ann. med. exper. et biol. fenn. 28, 72 (1950); 29, 251, 309 (1951). — VOLFINO, G., u. A. FONTANA: Zbl. Bakter. I Orig. 42, 666 (1906). — WASSERMANN, A., u. M. FICKER: Klin. Wschr. 1922, 1101. — WILE, J.: J. of Exper. Med. 23 (1906). — ZINSSER, H.: J. of Exper. Med. 21, 213 (1914); 24, 561 (1916).

**Anschrift:** Priv.-Doz. Dr. K. MEINICKE, München 15, Frauenlobstr. 9, Dermatologische Universitätsklinik



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41547414\\_0047](https://archive.org/details/IA41547414_0047)

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. A. MARCHIONINI)

## **Züchtungsversuche des *Treponema pallidum* auf künstlichem Nährboden\***

Von **KURT MEINICKE**

Zwei grundlegende Entdeckungen haben in den letzten Jahren die Diagnostik und Therapie der Lues so weitgehend beeinflußt, daß die schon seit Jahrzehnten gesammelten Erfahrungen und Erkenntnisse auf diesem Gebiet neu überprüft und ergänzt werden müssen. Die therapeutischen Möglichkeiten wurden durch die Einführung des Penicillins und anderer Antibiotica mit treponemicider Wirkung wesentlich erweitert. In vielen Fällen ging man dazu über, die bisher durchgeführte Therapie mit Salvarsan-Wismut zu verlassen und ganz, oder doch zumindest in erster Linie, die neuen Therapeutica zu verwenden. Man

war bemüht, die Wirkung des Penicillins kennzulernen und sich über den klinisch sichtbaren Heilungsverlauf hinaus Klarheit zu verschaffen. So gewannen auch Fragen der serologischen Diagnostik, zum Teil als Folge neuer therapeutischer Möglichkeiten, zum Teil bedingt durch die erhebliche Zunahme der Lues in der Kriegs- und Nachkriegszeit, eine immer größere Bedeutung. Eine exakte titrimetrische Auswertung der Seren, die schon von BOAS, KAUP, GAEHTGENS, KROMAYR und TRINCHOSE, E. MEINICKE, KAHN, PÖHLMANN u. a. gefordert wurde, stand jetzt im Vordergrund des Interesses.

Auf Grund der erheblichen Zunahme unspezifischer Ausfälle in den Lipoidbindungsreaktionen in den

\* Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür ihr auch an dieser Stelle nochmals gedankt sei.

Jahren nach 1940 bemühte man sich, durch eine Verbesserung und Standardisierung der Extrakte zu eindeutigeren Ergebnissen zu gelangen.

1941 isolierte PANGBORN das erste brauchbare, chemisch weitgehend gereinigte Luesantigen *Cardiolipin* aus Rinderherzen. 1949 berichtete UROMA über ein neues Antigen zur Serumdiagnose der Lues, das er aus Weizenkeimlingen gewann. UROMA nannte dieses aus Weizenkeimlingen isolierte Phosphatid *Sitolipin*. Sowohl *Cardiolipin* als auch *Sitolipin* sind nur in Verbindung mit Lecithin und Cholesterin bzw. Tolu balsam in alkoholischer Lösung als Extrakte in den bisher gebräuchlichen Komplementbindungs- und Flockungsreaktionen zu verwenden. Wenn durch die Isolierung der serologisch wirksamen Substanzen auch eine bessere Möglichkeit der Antigenstandardisierung zu erzielen war, und sowohl *Cardiolipin* als auch *Sitolipin* in den Komplementbindungsreaktionen eine größere Spezifität im Vergleich mit ungereinigten Lipoidextrakten zeigten, so erfolgte doch keine grundsätzliche Änderung in der bisherigen serologischen Diagnostik.

Den entscheidenden Wendepunkt in der serologischen Diagnostik der Lues brachte die Entwicklung des *Treponema pallidum*-Immobilisierungstests durch NELSON und MAYER im Jahre 1948. Dieser Test besitzt für die Diagnose der Lues eine ähnlich grundlegende Bedeutung wie das Penicillin für die Therapie. Diese Reaktion, bei der virulente Treponemen als Antigen dienen, kann wohl erstmalig als eine spezifische, routinemäßig durchführbare Antigen-Antikörperreaktion bei Lues angesehen werden. NELSON und MAYER entwickelten eine Nährflüssigkeit (Basalmedium), in der virulente Treponemata pallida über mehrere Tage hinweg beweglich und infektionstüchtig erhalten werden konnten. Auf Grund dieser Arbeiten war es möglich, virulente Treponemen zum Nachweis spezifischer immobilisierender Antikörper in Serum und Liquor zu benutzen.

Die großen technischen Schwierigkeiten dieser Reaktion und die Gefährdung der Untersucher führten dazu, nach Wegen zu suchen, die es gestatteten, mit abgetöteten Treponemata pallida spezifische Antigen-Antikörperreaktionen durchzuführen. HARDY, MCLEOD, MAGNUSON u. a. entwickelten mit abgetöteten Treponemen eine *Agglutinationsreaktion*, und NELSON berichtete über eine *Immun-Adhärenzreaktion*. Wir versuchten, mit abgetöteten Treponemata pallida eine *Komplementtiter-* und eine *Komplementbindungsreaktion* auszuarbeiten. Für alle Versuche in dieser Richtung lagen jedoch die größten Schwierigkeiten darin, ausreichende und weitgehend gereinigte Antigenmengen zu gewinnen. NELSON, HARDY und wir benutzten für die Versuche virulente Treponemen, die in Tierpassagen gehalten wurden (NICHOLS).

GAETGENS beschrieb schon 1929 eine Komplementbindungsreaktion mit einer wäßrigen Treponemenaufschwemmung als Antigen. Es gelang ihm, aus Treponemen, die auf künstlichen Nährböden züchtbar waren (REITER), unter Zusatz von Karbol ein wäßriges Antigen zu gewinnen, das sehr sensibel und spezifisch reagierte. Er bezeichnete die von ihm angegebene Komplementbindungsreaktion mit Kulturspirochaetales als „*Pallida*“-*Reaktion*, um hiermit auszudrücken, daß es sich um eine echte Antigen-Antikörperreaktion auf Lues handelt. D'ALESSANDRO, PUCCINELLI u. a. haben sich eingehend mit der Antigenstruktur der Kulturspirochaetales beschäftigt und den — ihrer Meinung nach — spezifischen Charakter dieser Antigen-Antikörperreaktion hervorgehoben.

1948 berichtete ROEMER über eine *Agglutinationsreaktion* bei Lues mit einem Spirochaetenantigen

(REITER). Von zahlreichen Autoren wird immer wieder auf den spezifischen Charakter dieser Komplementbindungs- und Agglutinationsreaktionen mit Kulturspirochaetales hingewiesen. Es wird betont, daß es sich hierbei um Treponemata pallida handelt, die auf Grund zahlreicher Passagen auf künstlichen Nährböden ihre Pathogenität verloren hätten. Die morphologischen Unterschiede zwischen Kulturspirochaetales und pathogenen Treponemata pallida werden mit Mutationen und Veränderungen der Erreger auf Grund jahrelanger Züchtung auf künstlichen Nährböden erklärt. Zum Vergleich für das unterschiedliche Verhalten werden Leptospiren und der BCG-Stamm der Tuberkulose herangezogen.

Wir bemühten uns, auf Grund kritischer Sichtung und Verarbeitung der Literatur sowie eigener experimenteller Versuche die Frage zu klären, *ob es sich bei den Kulturspirochaetales um saprophytische Spirochaetales oder um Treponemen handelt, die bis auf morphologische und Pathogenitätsunterschiede mit dem Erreger der Lues identisch sind*. Diese Versuche waren für eine Beurteilung und Bewertung spezifischer Antigen-Antikörperreaktionen bei Lues eine notwendige Voraussetzung.

#### *Bisherige Versuche, das Treponema pallidum auf künstlichen Nährböden zu züchten*

1786 glaubte J. HUNTER durch Verimpfung von Trippereiter in Selbstversuchen den Beweis erbracht zu haben, daß Lues und Gonorrhoe dieselbe Krankheit seien. Er glaubte ferner, daß eine Übertragung der Lues auf Tiere nicht möglich wäre. Fast ein ganzes Jahrzehnt haben diese Behauptungen als ein Dogma gegolten. Erst auf Grund der Arbeiten einiger Forscher, die über erfolgreiche Übertragungsversuche auf Tiere berichteten, tauchten Zweifel an der Richtigkeit der Ansichten HUNTERS auf. So beschrieb LANCEROX 1874 gelungene Übertragungen von menschlichem Syphilismaterial auf Kaninchen, KLEBS 1878 auf Affen und HAENSELL 1881 auf Kaninchencornea. Erst 1903 jedoch haben METSCHNIKOFF und ROUX im Institut Pasteur mit Sicherheit typische Ulcera dura nach Inoculation syphilitischen Materials bei Schimpansen und niederen Affen beobachtet. Trotzdem blieben alle ätiologischen Überlegungen im Hinblick auf diese Krankheit bis zur Entdeckung des Erregers der Syphilis durch SCHAUDINN und E. HOFFMANN im Jahre 1905 letztlich Hypothesen.

Schon kurze Zeit nach der Entdeckung des Treponema pallidum bemühten sich zahlreiche Forscher, so SCHAUDINN, LEVADITI, WASSERMANN und FICKER, SCHERESCHEWSKI, NOGUCHI, KROO, W. H. HOFFMANN u. v. a., den Erreger der Syphilis auf künstlichen Nährböden in Reinkultur zu züchten. Bei allen Züchtungsversuchen des Treponema pallidum sind bisher zwei grundsätzlich verschiedene Wege beschritten worden. Der größere Teil der Forscher benutzte als Ausgangsmaterial Primäraffekte, Sekundärpapeln, zumindest aber Effloreszenzen florider Lues, in denen mit größter Wahrscheinlichkeit neben dem Treponema pallidum noch andere Mikroorganismen vorhanden waren. Man ging also, mehr oder weniger bewußt, von Mischkulturen aus, und versuchte dann, durch Passagen auf halbstarren oder festen Kulturmedien zu einer Trennung der verschiedenen Mikroorganismen und damit zu einer

Isolierung des *Treponema pallidum* zu gelangen. Da die Erfahrung gelehrt hat, daß die Anpassungsfähigkeit pathogener Mikroorganismen an künstliche Nährböden meist geringer ist als die apathogener Keime, war es von vornherein ein besonders schwieriges Unterfangen, die viel anspruchsloseren saprophytischen Spirochaetales von den hochempfindlichen, virulenten *Treponemata pallida* zu trennen. Der zweite und vielleicht aussichtsreichere Versuch ging davon aus, für die Kultur möglichst reine, d. h. nur *Treponema pallidum* enthaltende Gewebstücke oder Organflüssigkeiten als Ausgangsmaterial zu verwenden. Hierzu benutzte man vor allem Liquores von Luikern oder Hoden syphilitischer Kaninchen, die unter streng aseptischen Kautelen exstirpiert wurden. Inguinale Drüsen als reines Ausgangsmaterial zu benutzen, gilt auch heute noch als fragwürdig, da in zahlreichen Fällen in diesem Gewebe andere Mikroorganismen, z. B. saprophytische Genitalspirochaetales, nachgewiesen wurden.

Für das Gelingen einer Züchtung der Treponemen auf künstlichen Nährböden war es wichtig, Kenntnis über die Lebensbedingungen dieser Mikroorganismen zu erhalten. Schon 1906 wies E. HOFFMANN darauf hin, daß das *Treponema pallidum* vor allem wegen seines üppigen Wachstums in mazerierten Feten und der großen Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff sicherlich ein anaerober Parasit wäre. Man hat sich ganz allgemein dieser Ansicht angeschlossen und ist auch heute der Meinung, daß das *Treponema pallidum* ein strikter Anaerobier ist. Die gute Vermehrung der Treponemen in Kaninchenhoden und Lebern syphilitischer Feten im Gegensatz zu flüssigen Medien, wie Blut, Liquor usw., erhöhte die Wahrscheinlichkeit, daß nach Zugabe von Gewebstücken zu halbstarren oder flüssigen Nährböden ein besseres Überleben des *Treponema pallidum* zu erwarten wäre.

Es ist naturgemäß sehr schwierig, diejenigen chemischen und physikalischen Bedingungen herauszufinden, unter denen *Treponemata pallida* auf künstlichen Nährböden gedeihen können. BRAUN wies wiederholt darauf hin, daß die üblichen, Pepton-Fleischwasser und andere animalische Stoffe enthaltenden Nährböden in chemischer Hinsicht außerordentlich kompliziert und in ihrer Zusammensetzung nicht konstant sind. Die von ihm geforderte Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels von Mikroorganismen ist bei den *Treponemata pallida* sehr schwer durchzuführen, da diese Mikroorganismen nicht mit Sicherheit eine Vermehrung auf künstlichen Nährböden zeigen.

Da die ersten Versuche der Züchtung virulenter Treponemen auf künstlichen Nährböden erfolglos verliefen, bemühte man sich schon sehr bald, zunächst einen brauchbaren Nährboden für saprophytische Spirochaetales zu entwickeln.

Es gelang MÜHLENS 1906, das *Treponema dentium* nach einer Methode von ELLERMANN auf Pferdeserumagar (1:3) in hoher Schicht, anfangs mit einem Begleitbakterium, und später in Reinkultur zu züchten. Eine Trennung der saprophytischen Mundspirochaetales in *Treponema microdentium* und *macrodentium* führte MÜHLENS noch nicht durch. Zahlreiche Forscher versuchten, mit dieser Methode auch das *Treponema pallidum* zu züchten. Positive Ergebnisse der Kulturversuche auf diesem Nährboden mit *Treponema pallidum* wurden jedoch vorerst nicht berichtet. VOLTINO und FONTANA brachten excidierte Papelstückchen in einen Nährboden, der Blut bzw. Serum enthielt und beobachteten eine Vermehrung des Trepo-

nema *pallidum*. Gleichzeitig entwickelte sich eine starke Mischkultur, und es kam zu einer Überwucherung der Treponemen auf den frischen Gewebstücken mit anderen Mikroorganismen. EITNER konnte auf Grund seiner Nachuntersuchungen die von VOLTINO und FONTANA beobachtete Vermehrung der Treponemen nicht bestätigen.

LEVADITI und MCINTOSH verbrachten Reizserum eines Affenprimäraffektes, das zahlreiche *Treponemata pallida* enthielt, in Kollodiumsäckchen, die mit menschlichem und tierischem Serum gefüllt waren, das zuvor  $\frac{1}{2}$  Std auf 60° C erhitzt worden war. Die Kollodiumsäckchen wurden in die Bauchhöhle von Affen verbracht und die Tiere gleichzeitig am oberen Lidrand mit Material aus einem Primäraffekt geimpft. Nach 23 Tagen trat am oberen Lidrand ein Primäraffekt auf. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Inhalt der Kollodiumsäckchen untersucht. Neben Bakterien fanden sich zahlreiche Spirochaetales, die nach Angaben von LEVADITI morphologisch mit *Treponemata pallida* übereinstimmten. Übertragungsversuche mit dem Inhalt dieser Kollodiumsäckchen auf Affen gelangen nicht. MÜHLENS und LÖHE führten Nachuntersuchungen durch, konnten jedoch die Befunde von LEVADITI nicht bestätigen.

In weiteren Versuchen zur Züchtung des *Treponema pallidum* benutzte MÜHLENS flüssige und feste Nährböden, und zwar Bouillon aus Affen- oder Kaninchenlebern, unter Zusatz von Pferde- bzw. Affenserum, Agar und Pferdeserum (2:1), Placentaagar (nach KUTSCHER) mit oder ohne Traubenzucker, mit Pepton und verschiedenen Serumarten. Die Resultate der sehr zahlreich durchgeführten Versuche bezüglich einer Züchtung des *Treponema pallidum* waren negativ. 1909 berichtete MÜHLENS erstmalig, daß es ihm gelungen sei, Spirochaeten zu züchten, die im Aussehen von dem *Treponema pallidum* nicht zu unterscheiden waren. Der Nährboden bestand aus einem 3%igen, schwach alkalischen Agar und Pferdeserum. Zuerst erhielt MÜHLENS Mischkulturen, die er jedoch nach und nach reinigen konnte. Alle Kulturen waren von einem üblen Geruch begleitet, so daß die Vermutung nahelag, daß es sich hierbei um *Treponemata microdentia* gehandelt haben könnte. MÜHLENS weist selbst darauf hin, daß seine Kulturspirochaetales sich in bezug auf das Wachstum ähnlich verhalten hätten wie das *Treponema dentium*. Auch W. H. HOFFMANN, der die Arbeiten von MÜHLENS fortführte, kam zu gleichen Ergebnissen und stellte neben einer Verflüssigung des Nährbodens in allen Fällen einen üblen Geruch fest.

SCHERESCHEWSKI, der sich von 1907—1913 sehr eingehend mit der Züchtung des *Treponema pallidum* beschäftigt hatte, berichtete 1909, daß es ihm gelungen wäre, Treponemen auf künstlichen Nährböden zu züchten, daß er jedoch von der Identität der Mikroorganismen mit dem Erreger der Syphilis nicht überzeugt wäre. SCHERESCHEWSKI gab wörtlich an:

„1. Es gelingt wohl, aus syphilitischem Material Spirochaetales zu züchten, die mikroskopisch auf keine Weise von dem echten *Treponema pallidum* zu unterscheiden sind.

2. Es ist weder durch Agglutination, Präzipitation, noch durch den Komplementbindungsversuch gelungen, spezifische Beziehungen zwischen den Kulturspirochaetales und Luikerseren nachzuweisen.

3. Versuche einer Kutireaktion waren erfolglos.

4. Die gezüchteten Spirochaetales waren nicht tierpathogen.“

1912 und 1913 glaubte SCHERESCHEWSKI jedoch, daß es ihm gelungen sei, die Züchtung des *Treponema pallidum* auf künstlichen Nährböden durchzuführen. Er gab an, daß auf Grund positiver Tierversuche der Beweis für die Identität der von ihm gezüchteten Kulturspirochaetales mit dem *Treponema pallidum* vorläge. 1914 beschrieb er diese Tierversuche.

Eine Reinkultur der 7. Passage wurde auf ein Kaninchen übertragen. Die Injektion erfolgte am oberen Pol des Hodens. Nach 41 Tagen war eine Ulceration zu beobachten. SCHERESCHEWSKI hielt es für möglich, daß im verimpften Material noch *Treponemata pallida* von der syphilitischen Papel, die er als Ausgangsmaterial benutzt hatte, vorhanden waren. Bei einem weiteren Versuch wurde eine Reinkultur in das Scrotum

eines Kaninchens gespritzt und in die Cornea eingerieben. Im Scrotum konnten keine Veränderungen festgestellt werden, an der Cornea beobachtete SCHERESCHEWSKI eine Keratitis parenchymatosa ohne Vascularisation. Die Kulturen von SCHERESCHEWSKI wuchsen ohne den üblen Geruch, den MÜHLENS und W. H. HOFFMANN bei ihren Kulturversuchen festgestellt hatten.

Nach den Untersuchungen von NOGUCHI wachsen auch *saprophytische Spirochaetales*, die dem *Treponema pallidum* ähnlich sind, *ohne Geruch*, so z. B. das *Treponema macrodentium*, *Treponema calligyrum* und *Treponema genitale*.

Auch TOMASCZEWSKI berichtete 1912 über Erfolge bei der Züchtung des *Treponema pallidum*. In Tierversuchen, die er mit Mischkulturen durchführte, ist es ihm nach seinen Angaben gelungen, syphilitische Erscheinungen beim Kaninchen zu erzeugen. Es bleibt jedoch auch hier die Frage offen, inwieweit in den Mischkulturen noch infektiöse Erreger aus dem Ausgangsmaterial enthalten waren. Auffallend ist, daß es ihm nicht gelang, die Erreger in Tierpassagen weiterzupflanzen.

SHAMINE berichtete ebenfalls über positive Züchtungsversuche, bei denen er von Mischkulturen ausgegangen war. Bei der Übertragung auf Kaninchen war er sich nicht völlig sicher, ob die Infektion angegangen war. *Die Kulturen wuchsen geruchlos*. SOVADE berichtete 1911, daß es ihm gelungen sei, mit Mischkulturen durch intrakardiale Injektionen bei Kaninchen eine Syphilis zu erzeugen. SOVADE meinte jedoch, daß die gelungene Übertragung von der Kultur auf das Kaninchen möglicherweise durch noch überlebende *Treponemata pallida* aus dem Ausgangsmaterial erfolgt sein könnte. SOVADE benutzte für seine Impfungen Mischkulturen in 1.—3. Passage. *In allen Kulturen wuchsen die Treponemen mit einem üblen Geruch*.

Die von STERZI und STANDACHER unternommenen Versuche, das *Treponema pallidum* auf die Chorionallantois-Membran von Hühnerembryonen zu verimpfen, gelangen nicht. Virulente *Treponemata pallida* waren nicht länger als 4 Std bei 37° C beweglich, und es konnten nach dieser Zeit auch keine Infektionen bei Kaninchen erzeugt werden. WILE und SNOW führten ähnliche Versuche durch und sahen ein Überleben einer geringen Anzahl von Organismen in Hühnerembryonen, die 8 Tage lang bei 35° C gehalten wurden. Bei einer Kontrolle dieser Überimpfungsversuche auf Hühnerembryonen bei 37° und 37,5° C kamen sie zu ähnlichen Ergebnissen wie STERZI und STANDACHER.

Von besonderem Interesse für unsere Untersuchungen sind die Kulturen, die WASSERMANN und FICKER auf künstlichen Nährböden anlegten, und die später von REITER fortgezüchtet wurden. Als Ausgangsmaterial benutzten WASSERMANN und FICKER Primäraffekte. *In allen Fällen handelte es sich also um Mischkulturen*, von denen sie nach und nach zu Reinkulturen gelangten. Es gelang ihnen, aus dem Material von 80—90 Primäraffekten 7 Reinkulturen zu gewinnen. Sie bezeichneten die Kultur B 36 als besonders rein und gaben an, daß es ihnen gelungen sei, beim Kaninchen nach Überimpfung mit dieser Kultur syphilitische Erscheinungen zu erzeugen. Dieser Stamm ließ sich auch nach den Angaben der Autoren von Tier zu Tier fortzüchten. Auch eine gelungene Rückimpfung vom Kaninchen auf den künstlichen Nährboden gab FICKER an. *Die Kulturen wuchsen ohne Geruch*.

REITER bemühte sich, optimale Nährböden zu finden, auf denen er anfangs vor allem *saprophytische Spirochaetales* aus der Mundhöhle züchtete. Später

benutzte er diese Nährböden, um die von WASSERMANN und FICKER isolierten Stämme weiter in Passagen zu züchten. Die Reinkulturen von *saprophytischen Spirochaetales* hatten nach seinen Angaben einen aromatischen, nicht unangenehmen Geruch.

Als Nährmedium benutzte er unter anderem normales Kaninchen Serum, das mit einer 1%igen Normosallösung gemischt war, und in das Meerschweinchen- oder Kaninchengehirnstücke eingeführt wurden. Das Nährmedium wurde 24 Std auf 56° C erwärmt und anschließend auf Sterilität geprüft. Die Beimpfung geschah mittels Capillaren und anschließender Übersichtung mit sterilem Paraffinöl oder weißer Vaseline. Die Kulturen wurden bei 37° C bebrütet und ein Wachstumsoptimum nach 4 Tagen erzielt. Die Kulturen mit *Spirochaetales* blieben nach Angaben REITERS klar und geruchlos.

Außer den angeführten Autoren haben noch zahlreiche weitere Forscher, so ARISTOWSKY, HOLTZER, KROO, ZINSSER u. a. versucht, virulente *Treponemata pallida* auf künstlichen Nährböden zu züchten. Fast immer ging man hierbei von *Mischkulturen* aus.

Besondere Beachtung verdienen die eingehenden und sorgfältigen Versuche von NOGUCHI. Es gelang ihm, zahlreiche *saprophytische Genitalspirochaetales* in Reinkultur zu züchten und durch kulturelle und serologische Unterscheidungsmerkmale zu einer Trennung der verschiedenen Arten zu gelangen. Es ist sein Verdienst, die Systematik der *Spirochaetales*, insbesondere der *saprophytischen Genitalspirochaetales*, aufgestellt zu haben. Er bemühte sich auch, das *Treponema pallidum* in Reinkultur auf künstlichen Nährböden zu züchten. Er benutzte hierzu in erster Linie *Treponemata pallida*, die er aus Kaninchenhoden gewonnen hatte. *Es verwundert jedoch, wenn er schreibt, daß die Treponemen in der ersten Passage gemeinsam mit anderen Bakterien wuchsen*. Es ist daraus zu schließen, daß entweder die *Treponemenstämme*, die in Kaninchenpassagen gehalten wurden, nicht rein waren, oder daß bei der Überimpfung eine Verunreinigung mit anderen Mikroorganismen eingetreten war. NOGUCHI prüfte zahlreiche Kulturmedien und stellte fest, daß reines Kaninchenplasma und Pferdeserum, Serumwasser, Serumagar allein nicht zur Kultivierung des *Treponema pallidum* geeignet sind.

Er führte die Züchtungsversuche unter streng anaeroben Bedingungen durch und fand als geeigneten Nährboden Serumwasser, und zwar 1 Teil Serum und 3 Teile Wasser, mit einem Zusatz von großen Stücken frischer Niere oder Hoden gesunder Kaninchen. Er benutzte Röhren von 20 cm Länge und 1,5 cm Breite, in die er zuerst frisches Gewebe hineingab und dann bis 15 cm mit Serumwasser auffüllte. Er übersichtete das Nährmedium anschließend mit Paraffinöl in 3 cm Höhe. Die Röhren wurden nach Beimpfung durch Einleiten von Wasserstoff mit dem KIPPSCHE Apparat von Sauerstoff befreit. Dann setzte er die Röhren in eine Anaerobierglocke, deren Boden mit Pyrogallol-Lösung bedeckt war. Der ganze Apparat wurde anschließend verschlossen und nach ausreichendem Vakuum eine konzentrierte sauerstofffreie Kalilösung zugesetzt (Kontrolle zum Nachweis von O<sub>2</sub>-Spuren im Anaerostaten). Nach nochmaliger Durchleitung von Wasserstoff wurde der Apparat durch Unterdruck geschlossen und in den Brutschrank gestellt. Die Kulturröhren wurden erst nach 2 Wochen geöffnet, da sich nach den Erfahrungen von NOGUCHI eine frühere Kontrolle schädigend auf das Wachstum der Mikroorganismen auswirkte.

NOGUCHI gab an, daß es ihm mit diesem Verfahren gelungen sei, 6 *Treponema pallidum*-Stämme und 1 *Treponema pertenue*-Stamm in Reinkultur zu züchten. Da auch seine Kultur in der ersten Passage mit anderen Bakterien in Mischkultur wuchs, benutzte

er zur Trennung der Begleitbakterien von den Kulturspirochaetales ein Berkefeld-Filter. Er gab an, daß das Berkefeldfilter die Spirochaetales zwar nicht direkt passieren läßt, daß jedoch bei einer Kultur im Berkefeldfilter nach 5 Tagen ein Durchtritt der Treponemen zu beobachten wäre. Die Pathogenität der Kulturspirochaetales prüfte er durch Überimpfung auf Kaninchen. Bei 2 von 8 Kaninchen, die er mit einem Kulturstamm impfte, und bei 3 von 4 Kaninchen, die er mit einem 2. Stamm impfte, konnte er eine syphilitische Orchitis mit einem großen Reichtum an Treponemen feststellen. Es ist aus der Arbeit von NOGUCHI nicht zu ersehen, welche Kulturpassage er für seine Pathogenitätsprüfung benutzt hat. Nach den Angaben von NOGUCHI sind folgende Punkte für die Züchtung virulenter Treponemata pallida auf künstlichen Nährböden zu beachten:

1. die Gegenwart von sterilem, frischem Gewebe im Kulturmedium,
2. vollkommene Anaerobie,
3. eine leicht alkalische Reaktion des Nährmediums,
4. Temperaturen von 35—37° C.

Die Kulturen von NOGUCHI wuchsen immer ohne Geruch und nur bei Zusatz von frischem Gewebe.

NOGUCHI schickte seine Kulturen an ROUX und LEVADITI im Institut PASTEUR. LEVADITI und DANULESCO haben diese Kulturen eingehend untersucht und geäußert, daß es sich um saprophytische Spirochaetales handelt, und zwar um die von LEVADITI als Spirochaeta gracilis bezeichnete Art. JAHNEL untersuchte zu einem späteren Zeitpunkt die Kulturen von NOGUCHI und fand, daß sie zwar auf dem von REITER angegebenen Nährboden nicht züchtbar waren, jedoch nach seiner Meinung auch in die Gruppe der saprophytischen Genitalspirochaetales gehörten.

Die wichtigsten Nachuntersuchungen über die Kulturspirochaetales führten in Amerika KAST und KOLMER, und in Deutschland JAHNEL durch. Sowohl KAST und KOLMER als auch JAHNEL züchteten selbst saprophytische Spirochaetales, um Vergleichsmöglichkeiten mit den angeblichen Treponemata pallida auf künstlichen Nährböden zu besitzen, KAST und KOLMER gingen so weit, daß sie einzelnen Kulturmedien auch Bakterien zusetzten, um die Möglichkeit einer Begünstigung des Wachstums virulenter Treponemata pallida durch Bakterien in ihre Versuche einzuschließen. Sie benutzten als Ausgangsmaterial syphilitische Papeln und Treponemata pallida aus Kaninchenhoden (NICHOLS) und kamen zu dem Schluß, daß „no true multiplication of Spirochaetales occurred in any of the media“. KAST und KOLMER wiesen darauf hin, daß die Spirochaetaleskulturen von REITER nicht dieselben sind, wie die von NOGUCHI, da die Kulturen von NOGUCHI nicht auf den Nährböden wachsen, die REITER angegeben hat.

JAHNEL berichtete 1934, daß es ihm nicht gelungen sei, das Treponema pallidum auf irgendeinem der in der Literatur angegebenen Kulturmedien zu züchten. JAHNEL ließ sich die verschiedenen angeblichen Treponema pallidum-Kulturen schicken, so die von WASSERMANN und FICKER, KROO, ARISTOWSKY, NOGUCHI, REITER, KOLMER, ZINSSER u. a. Es gelang ihm ohne Schwierigkeiten, die Kulturspirochaetales in weiteren Passagen zu erhalten. Er stellte fest, daß sämtliche Kulturspirochaetales in morphologischer, biologischer und biochemischer Hinsicht unterschied-

liche Merkmale gegenüber dem Treponema pallidum besaßen, daß sie jedoch in diesen 3 Merkmalen eine enge Verwandtschaft mit den von ihm gezüchteten saprophytischen Spirochaetales zeigten.

Eigene Züchtungsversuche

Wir verwendeten für unsere Versuche ausschließlich Treponemata pallida (NICHOLS), die wir aus Kaninchenhoden spätestens 8 Tage nach der Inoculation gewonnen hatten. Mit einer Treponemenaufschwemmung in physiologischer NaCl-Lösung mit einem Gehalt von 20% inaktivierten Kaninchen-serums wurden Übertragungsversuche auf künstliche Nährböden vorgenommen. Die zuerst benutzten Nährböden waren nach den Angaben von REITER in folgender Weise hergestellt.

125 g frische Rinderleber wurde von Haut und Fett befreit und in 400 cm<sup>3</sup> Quellwasser <sup>3</sup>/<sub>4</sub> Std lang im Dampftopf gekocht. Anschließend wurde die Leber herausgenommen, abgespült und 1 Std im Heißluftschrank bei 150° C getrocknet. Die Leberbrühe wurde filtriert, mit 1% Pepton und 0,5% NaCl versetzt und eine weitere halbe Stunde im Dampftopf gekocht. Mit einer 10%igen Sodalösung wurde der p<sub>H</sub>-Wert auf 8,0 eingestellt. Nach einer weiteren halben Stunde Dampftopf wurde die Brühe durch ein doppeltes Papierfilter filtriert und anschließend mit 2% Traubenzucker versetzt. Die Leber wurde in kleine Stücke geschnitten und je 2—3 dieser Stücke in Röhrchen von 8 cm Länge und 1 cm Weite verbracht. Die Röhrchen wurden daraufhin 20 min bei 120° C autoklaviert und sodann mit Leberbouillon aufgefüllt. Die Nährflüssigkeit wurde mit 3 mm sterilem Paraffinöl überschichtet und die Röhrchen mit einem Gummistopfen verschlossen. Abschließend wurden die Röhrchen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen für 1 Std in den Dampftopf gegeben.

Es gelang uns trotz zahlreicher, sich über mehrere Monate erstreckende Wiederholungen unserer Versuche in keinem Fall, ein Wachstum virulenter Treponemen nach der Überimpfung auf den Reiter-Nährböden zu erzielen. Die gleichzeitig zur Kontrolle überimpften saprophytischen Spirochaetales gediehen auf diesen Nährböden sehr gut und zeigten zwischen dem 5. und 7. Tag ihr Wachstumsoptimum. Um die anaeroben Bedingungen der Nährflüssigkeit zu verbessern, setzten wir dem oben beschriebenen Nährboden 120 mg Natriumthioglykolat je 100 cm<sup>3</sup> Nährbodenflüssigkeit zu. Auch bei dieser Versuchsanordnung konnten wir kein Wachstum virulenter Treponemen beobachten. In einem weiteren Versuch fügten wir alle Substanzen, die im Basalmedium von NELSON und MAYER enthalten sind, dem Reiter-Nährboden hinzu, und zwar:

|                                            |                           |
|--------------------------------------------|---------------------------|
| Rinderalbumin . . . . .                    | 2,00 g                    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . . | 0,36 g                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .  | 0,05 g                    |
| Natriumpyruvat . . . . .                   | 0,01 g                    |
| Natriumthioglykolat . . . . .              | 0,12 g                    |
| Glutathion . . . . .                       | 0,03 g                    |
| Cysteinhydrochlorid . . . . .              | 0,02 g                    |
| Natriumbicarbonat . . . . .                | 0,06 g                    |
| Rinderserum-Ultrafiltrat . . . . .         | 5,00 cm <sup>3</sup>      |
| Reiter-Nährbodenflüssigkeit . . . . .      | ad 100,00 cm <sup>3</sup> |

Der p<sub>H</sub>-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

Auch auf diesem Nährboden gelang es uns nicht, virulente Treponemen zu züchten. Wir benutzten für das zuletzt angegebene Nährmedium zuerst Aqua bidest. und später ausschließlich Quellwasser, da es sich bei Kontrollen gezeigt hatte, daß die Anzahl der beweglichen Treponemen bei Benutzung von Quellwasser nach 48 Std um 30% höher lag als bei der Anwendung von Aqua bidest. Auch auf Grund unserer

eigenen Versuche mußten wir feststellen, daß eine Züchtung virulenter *Treponemata pallida* auf dem von REITER angegebenen Nährboden und Modifikationen der Nährflüssigkeit nicht gelang. Die Kulturspirochaetales Reiter zeigten jedoch ein üppiges Wachstum auf diesen Nährböden. Ein Geruch dieser Spirochaetales auf den verschiedenen Nährböden wurde nicht festgestellt. Wir führten alle Versuche unter streng anaeroben Bedingungen durch und verwendeten außer reduzierenden Substanzen in den Nährböden Anaerostaten zur Aufnahme der Kulturröhrchen. Die Anaerostaten wurden nach der Beschickung mit den Kulturröhrchen mehrmals evakuiert und ein Gemisch von 95% Stickstoff und 5% CO<sub>2</sub> eingeleitet. Die Bebrütung erfolgte im Brutschrank bei 35° C.

#### Diskussion

Es ist nicht leicht, aus der Vielzahl der sich zum Teil widersprechenden Angaben in der Literatur ein klares Bild zu gewinnen, ob die Züchtung des *Treponema pallidum* auf künstlichen Nährböden wirklich gelungen ist. Nach den Versuchen von KAST und KOLMER, JAHNEL und unseren eigenen Erfahrungen kann der Erfolg einer Kultivierung virulenter *Treponemata pallida* in vitro nicht bestätigt werden. Der größte Teil der Forscher stand vor der schwierigen Aufgabe, das *Treponema pallidum* erst aus einer Mischkultur zu isolieren. Es lag die Gefahr nahe, daß durch die Mutationsmöglichkeiten aller Mikroorganismen auf künstlichen Nährböden apathogene, saprophytische Genitalspirochaetales in Kulturpassagen in ihrer Morphologie *Treponema pallidum*-ähnliche Formen zeigen konnten. Es lag jedoch auch im Bereich der Möglichkeit, daß *Treponemata pallida* ihrerseits durch Mutation auf künstlichen Nährböden Formen hervorbringen konnten, die der Morphologie saprophytischer Spirochaetales ähneln.

Ein wichtiger Punkt ist bei der Reinzüchtung des *Treponema pallidum* auf künstlichen Nährböden meistens außer acht gelassen worden, und zwar die Anwesenheit von Antikörpern im Ausgangsmaterial. Über die spezifische Natur der Antikörper besteht heute kein Zweifel mehr, und wir wissen, daß sie zu einer Immobilisierung der Treponemen mit folgender Lysis bei Anwesenheit von Komplement führen. So scheint uns sowohl für Tierpassagen als auch für den Übergang von menschlichem Material auf Versuchstiere, ebenso wie für den Übergang von menschlichem oder tierischem Material auf künstliche Nährböden gerade dieser Punkt von besonderer Bedeutung zu sein. Immobilisiert werden durch diese Antikörper allerdings nicht die saprophytischen Genitalspirochaetales, sondern ausschließlich *Treponemata pallida*. Bis auf die Arbeiten von NOGUCHI fanden wir bei keinem Autor, der über gelungene Kulturversuche mit *Treponema pallidum* berichtete, Angaben darüber, daß als Ausgangsmaterial zur Züchtung auf künstlichen Nährböden mit Sicherheit ausschließlich Reinkulturen virulenter *Treponemata pallida* benutzt wurden. Es verwundert, daß NOGUCHI in der 1. Passage seiner Kulturen neben *Treponema pallidum* noch andere Mikroorganismen vorfand, obwohl er mit größter Wahrscheinlichkeit von Reinkulturen ausging. Wir haben bei unseren Versuchen, bei denen wir als Ausgangsmaterial *Treponemata pallida* (NICHOLS) benutzten, die in Reinkulturen in Kaninchenhoden vor-

handen waren und zu einem Zeitpunkt gewonnen wurden, zu dem noch keine tiereigenen immobilisierenden Antikörper nachweisbar waren, bei der Überimpfung auf künstliche Nährböden in den meisten Fällen keinerlei Vermehrung irgendwelcher Mikroorganismen beobachten können. Wir stellten lediglich nach einigen Tagen fest, daß in den modifizierten Nährböden noch gut bewegliche *Treponemata pallida* vorhanden waren. In einigen wenigen Röhrchen der gleichen Versuchsreihe sahen wir allerdings Staphylokokken, in anderen bewegliche Stäbchen, und konnten die Anwesenheit dieser Mikroorganismen auf Verunreinigung während der Überimpfung zurückführen. Es scheint uns deshalb die Verwendung eines reinen Ausgangsmaterials, wie es von KAST und KOLMER, JAHNEL und auch uns benutzt wurde, für die Frage der Bewertung der Züchtungserfolge von vordringlicher Bedeutung zu sein.

Einige der Autoren, die über gelungene Züchtungsversuche des *Treponema pallidum* berichten, räumen ein, daß die Erreger auf künstlichen Nährböden ihre Pathogenität verloren hätten. So wies schon LEVADITI darauf hin, daß die Kulturen in den Kollodiumsäckchen nicht mehr tierpathogen waren. Auch die Kulturspirochaetales Reiter zeigten keine Pathogenität bei für Syphilis empfänglichen Tieren, wie wir selbst in eigenen zahlreichen Versuchen nachweisen konnten. JAHNEL verneinte die Möglichkeit, daß der Lueserreger im Kulturmedium seine Pathogenität gänzlich verlieren könnte und wies darauf hin, daß zwar auf künstlichen Nährböden auch bei anderen Krankheitserregern eine Virulenzminderung eintreten könnte, daß jedoch nach mehreren Tierpassagen fast immer eine Virulenzsteigerung zu beobachten wäre.

NOGUCHI, SHAMINE, WASSERMANN und FICKER, SCHERESCHESWSKI, MÜHLENS, W. H. HOFFMANN u. a. führten für den Beweis des Gelingens ihrer Kulturversuche mit dem *Treponema pallidum* in erster Linie an, daß es — ausgehend von diesen Kulturen — möglich war, bei Kaninchen oder Affen Syphilis zu erzeugen. In dem Basalmedium, das NELSON und MAYER angegeben haben, können noch nach 8 bis 12 Tagen bewegliche, infektionstüchtige *Treponemata pallida* nachgewiesen werden. Die von NOGUCHI u. a. benutzten Nährböden standen dem Basalmedium von NELSON und MAYER in bezug auf günstige Milieubedingungen für das *Treponema pallidum* kaum nach, so daß ohne weiteres an die Möglichkeit gedacht werden muß, daß mit den apathogenen, saprophytischen Kulturspirochaetales, die sich auf diesen Nährböden vermehrten, auch einzelne *Treponemata pallida* auf die Tiere überimpft wurden. Der verhältnismäßig lange Zeitraum (30—40 Tage), der nach der Beimpfung der Tiere mit massenhaftem Spirochaetalesmaterial bis zum Auftreten syphilitischer Erscheinungen (Orchitis, Primäraffekt) verstrich, deutet darauf hin, daß die Mehrzahl der überimpften Mikroorganismen sicherlich nicht *Treponemata pallida* waren. Wir haben bei unseren Versuchen bei mehr als 200 Tieren niemals beobachtet, daß eine Orchitis zu einem späteren Zeitpunkt als längstens 21 Tage nach der Inoculation auftrat. In den meisten Fällen begann die Orchitis zwischen dem 7. und 10. Tag und zwar dann, wenn mehr als 8 Treponemen je Blickfeld im Ausgangsmaterial vorhanden waren.

In einer weiteren Arbeit werden wir auf Grund eigener tierexperimenteller und serologischer Versuche zur Frage Stellung nehmen, ob mit *Kulturspirochaetales* (REITER) spezifische oder für *Lues* charakteristische Antigen-Antikörperreaktionen durchzuführen sind.

**Zusammenfassung.** Es werden Züchtungsversuche des Lueserregers auf künstlichen Nährböden kritisch besprochen. Auf Grund der Versuche von KAST und KOLMER, JAHNEL und unserer eigenen experimentellen Erfahrungen, über die im einzelnen berichtet wird, kann die erfolgreiche Züchtung virulenter *Treponemata pallida* auf künstlichen Nährböden nicht bestätigt werden. Es wird darauf hingewiesen, daß fast alle Forscher, die über positive Züchtungsversuche auf künstlichen Nährböden berichteten, von Mischkulturen ausgingen, und daß hierdurch die Wahrscheinlichkeit einer Kultivierung saprophytischer *Spirochaetales* größer war als die einer Züchtung der hochempfindlichen, virulenten *Treponemata pallida*.

**Literatur.** ARISTOWSKY, W., u. R. HOLTZER: Klin. Wschr. 1925, 2016. — BOAS, H.: Die Wassermann-Reaktion usw. Berlin: S. Karger 1922. — BRAUN, H.: Med. Wschr. 1953, 293. — D'ALESSANDRO, G., u. V. A. PUCCINELLI: Giorn. med. Italia 1, 68 (1944). — EITNER, E.: Münch. med. Wschr. 1907, 770. — ELLERMANN: Zit. P. MÜHLENS, Dtsch. med. Wschr. 1907, 1261. — GAEHTGENS, W.: Med. Klin. 1929, 390. HAENSELL, P.: Arch. vergl. Ophthalm. 27, 93 (1881). — HARDY, K.: Zit. BRUCK, Serodiagnose S. 318. 1924. — HOFFMANN, E.: Dtsch. med. Wschr. 1905, 43. — Dermat. Z. 13, 221, 561 (1905/06). — Münch. med. Wschr. 1911, 1769. — HOFFMANN, W. H.: Z. Hyg. 68, 27 (1911). — Berl. klin. Wschr. 1911, 60. — HUNTER, J.: Zit. in JADASSOHN'S Handbuch, Bd. XV/1, S. 167. 1927. — JAHNEL, F.: Klin. Wschr. 1934, 550. — KAHN, R. L.: Arch. of Dermat. 5, 570 (1922). — KAST, C. C., and J. A. KOLMER: Amer. J. Syph. 32, 421 (1929). — KAUF, J.: Kritik der Methodik der Wassermann-

Reaktion usw. Arch. f. Hyg. 87, 1 (1918). — KLEBS, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. Leipzig 1879. — KROMAYR, H., u. F. TRINCHESE: Med. Klin. 1912, 404. — KROO, H.: Zit. KOLLE-HETSCH S. 502. 1952. — LEVADITI, C., et J. DANULESCO: C. r. Soc. Biol. Paris 73, 256 (1912). — LEVADITI, C., A. MARIE et NICOLAU: C. r. Acad. Sci. Paris 172, 1542 (1921). — LEVADITI, C., et MCINTOSH: Ann. Inst. Pasteur 21, 784 (1907). — MCLEOD, C. H., and J. H. MAGNUSON: J. Ven. Dis. Inform. 32, 274 (1951). — Amer. J. Syph. 37, 9 (1953). — MEINICKE, E.: Klin. Wschr. 1929, 1080. — Dtsch. med. Wschr. 1937, 1040. — METSCHNIKOFF, E., et P. ROUX: Ann. Inst. Pasteur 1903, 809. — MÜHLENS, P.: Z. Hyg. 57, 405 (1907). — Klin. Jb. 23, 339 (1910). — MÜHLENS, P., u. LÖHE: Zbl. Bakter. I Orig. 47 (1908). — NELSON, R. A., and M. MAYER: J. of Exper. Med. 89, 369 (1949). — NOGUCHI, H.: J. of Exper. Med. 14, 99 (1911); 15, 90, 201 (1912); 16, 194 (1912); 17, 96 (1913); 27, 671 (1918). — Münch. med. Wschr. 1911; 1913. — Berl. klin. Wschr. 1912. — Z. Immun.forsch. 14 (1912). — Ann. Inst. Pasteur 30, 1 (1916). — J. Amer. Med. Assoc. 77, 2052 (1921). — PANGBORN, M.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 1941, 48. — J. of Biol. Chem. 137, 545 (1941); 143, 247 (1941); 153, 343 (1944). — Acta dermat.-vener. (Stockh.) 24, 152 (1952). — PÖHLMANN, A.: Arch. of Dermat. 5, 570 (1922). REITER, H.: Klin. Wschr. 1926, 444. — ROEMER, G.: Klin. Wschr. 1948, 574. — SCHAUDINN, F., u. E. HOFFMANN: Arb. ksl. Gesdh.amt 22, 528 (1905). — Berl. klin. Wschr. 1905, 673. — Dtsch. med. Wschr. 1909, 29; 1913, 1408. — SCHERESCHESKI, J.: Dtsch. med. Wschr. 1909, 1260; 1912, 1355; 1913, 1408. — Berl. klin. Wschr. 1920, 1142. — SHAMINE, T.: Zbl. Bakter. I Orig. 65 (1912). — SOWADE, H.: Dtsch. med. Wschr. 1911, 1934. — Arch. f. Dermat. 114, 247 (1913). — TOMASZEWSKI, E.: Berl. klin. Wschr. 1912, 1556. — UROMA, E., u. M. TUOMIOJA: Ann. med. exper. et biol. fenn. 28, 72 (1950); 29, 251, 309 (1951). — VOLPINO, G., u. A. FONTANA: Zbl. Bakter. I Orig. 42, 666 (1906). — WASSERMANN, A., u. M. FICKER: Klin. Wschr. 1922, 1101. — WILE, J.: J. of Exper. Med. 23 (1906). — ZINSSER, H.: J. of Exper. Med. 21, 213 (1914); 24, 561 (1916).

**Anschrift:** Priv.-Doz. Dr. K. MEINICKE, München 15, Frauenlobstr. 9, Dermatologische Universitätsklinik



*Sonderabdruck*  
*aus „Der Hautarzt“, 7. Jahrgang, 10. Heft, Oktober 1956, S. 448—457*

---

*Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg.*

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. A. MARCHIONINI)

## Tierexperimentelle und serologische Untersuchungen zur Trennung der Kultur-treponemen (Reiter) von virulenten *Treponemata pallida*\*

Von KURT MEINICKE

Mit 9 Textabbildungen

Im Hautarzt haben wir an anderer Stelle über Züchtungsversuche des *Treponema pallidum* auf künstlichen Nährböden berichtet. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse einzelner Autoren über eine angeblich gelungene Züchtung des *Treponema pallidum* stehen im Gegensatz zu den negativen Befunden sämtlicher Nachuntersucher und auch zu unseren eigenen experimentellen Erfahrungen. Eine endgültige Beantwortung der Frage, ob es sich bei den Kultur-treponemen (REITER), die in der serologischen Diagnostik der Lues als Antigen für Komplementbindungs- und Agglutinationsreaktionen benutzt werden, um saprophytische Mikroorganismen oder um eine nach jahrzehntelanger Züchtung auf künstlichen Nährböden auffällig veränderte Form des *Treponema pallidum* handelt, konnte erst auf Grund weiterer Untersuchungen einer Klärung nähergebracht werden.

Bevor wir über die Ergebnisse dieser Untersuchungen berichten, soll kurz auf die Morphologie und Biologie der verschiedenen Arten der Gattung *Treponema* Schaudinn eingegangen werden.

\* Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür ihr auch an dieser Stelle nochmals gedankt sei.

### *Systematik der Ordnung Spirochaetales*

Die heute allgemein angewandte bakteriologische Nomenklatur beruht auf den Beschlüssen, die 1947 auf dem internationalen Mikrobiologen-Kongreß in Kopenhagen gefaßt wurden. In Anlehnung an diese Beschlüsse haben im Jahre 1948 R. S. BREED, E. G. MURRAY und A. P. HITCHENS unter Mitarbeit zahlreicher Bakteriologen BERGEYS 1923 herausgegebenes „Manual for Determinative Bacteriology“ neu bearbeitet. Hiernach wird die Einteilung der Spirochaetales nach der in Tabelle 1 beschriebenen Weise vorgenommen. Die systematische Stellung der Spirochaetales war lange Zeit umstritten. So hielt z. B. DOFLEIN die Spirochaetales für Verwandte der Cyanophyceen, BRUMPT für Protozoen, und auch SCHAUDINN glaubte an eine enge Verwandtschaft des *Treponema pallidum* mit den Protozoen.

E. HOFFMANN betrachtete die Ordnung Spirochaetales als eine Zwischenstufe zwischen Protozoen und Bakterien. R. MÜLLER hielt die Spirochaetales für Bakterien. Die Spirochaetales besitzen weder einen lokalisierten Zellkern wie die Protozoen, noch diffus verteilte Kernsubstanz, sondern auf die ganze Länge

Tabelle 1. Die Einteilung der Ordnung Spirochaetales nach BERGEY

| Familie          | Gattung                  | Art                                                                                                                 |
|------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spirochaeta-ceae | 1. Spirochaeta Ehrenberg | Spirochaeta {plicatilis Ehrenberg<br>marina Zuelzer<br>daxensis Cantacuzena                                         |
|                  | 2. Saprospira Gross      | Saprospira {grandis Gross<br>lepta Dimitroff                                                                        |
|                  | 3. Cristospira           | {balbiani Certes,<br>Gross<br>Cristospira {pinnae Bergey<br>anadontes Keysselitz,<br>(Gross)                        |
|                  | 1. Borrelia              | {anserina Saharoff,<br>Bergey<br>recurrentis (Lebert),<br>Bergey<br>duttoni Breinl,<br>Bergey                       |
|                  |                          | Borrelia {buccale Steinberg<br>refringens Schaudinn,<br>Hoffmann<br>vincenti Blanchard,<br>Hoffmann                 |
|                  |                          | {gallinarum<br>pallidum Schaudinn<br>pertenu Castellani<br>microdentium<br>Noguchi                                  |
| Treponemata-ceae | 2. Treponema Schaudinn   | Treponema {mucosum Noguchi<br>calligyrum Noguchi<br>genitale Noguchi<br>cuniculi Noguchi<br>macrodentium<br>Noguchi |
|                  | 3. Leptospira Noguchi    | {ictero-haemor-<br>rhagiae Inada<br>et Ido<br>Leptospira {biflexa Noguchi<br>canicola Okell<br>hebdomadis Ido       |

des Spiralfadens in Abständen von einer halben Windung verteilte Chromatinkörner. Diese Chromatinkörner können nach PIEKARSKI den Nucleoiden der stäbchenförmigen Bakterien und Kokken gleichgestellt werden. Durch elektronenoptische Untersuchungen wurden die schon früher bei den größeren Arten der Spirochaetales beobachteten lichtmikroskopischen Befunde bestätigt. Es hat sich so die enge Beziehung der Spirochaetales zu den Bakterien als richtig erwiesen.

Die erste Familie der Spirochaetales, die Spirochaetaceae, brauchen im Zusammenhang mit unseren Überlegungen nicht näher untersucht zu werden. Es handelt sich hierbei ausschließlich um saprophytisch lebende Arten. Da jedoch die Gattung Spirochaeta dieser Familie und auch die Cristospira verhältnismäßig große Exemplare hervorbringen, sind zahlreiche Untersuchungen über den Aufbau der Spirochaetales gerade bei diesen Arten vorgenommen worden. Die Arten der Spirochaetaceae werden bis 500  $\mu$  lang und haben Spiralfäden von einer Breite zwischen 0,5 und 2,5  $\mu$ . Man hat dann auf Grund dieser Untersuchungen Rückschlüsse auf Treponemen und Borrelien gezogen.

Die zweite Familie der Spirochaetales, die Treponemataceae, setzt sich sowohl aus Saprophyten als auch aus pathogenen Arten zusammen. Durch die verhältnismäßig geringe Stärke war eine Beobachtung dieser Mikroorganismen im lebenden Zustand meist nur im Dunkelfeld möglich. Von der Familie Treponemataceae ist für unsere Untersuchungen die Gattung

Treponema Schaudinn und die Art Borrelia refringens von besonderem Interesse. Die Länge der Treponemataceae liegt zwischen 3 und 25  $\mu$ , die Breite zwischen 0,2 und 0,3  $\mu$ . Es ist das Verdienst von NOGUCHI, die verschiedenen Arten der Gattung Treponema Schaudinn vor allem kulturell und serologisch differenziert und eingehend beschrieben zu haben.

Morphologie und Biologie der verschiedenen Arten der Gattung Treponema Schaudinn

1. Treponema pallidum. Die für den Menschen wichtigste Art aus der Gattung Treponema Schaudinn ist das Treponema pallidum. Es ist ein korkzieherartiges, fadenförmiges Gebilde, dessen Länge nach den Angaben von OELZE im Mittel zwischen 4—15  $\mu$ , und nach SCHAUDINN und E. HOFFMANN in einzelnen Fällen sogar bis 25  $\mu$  beträgt. Die Dicke schwankt zwischen 0,2 und 0,3  $\mu$ . Die Zahl der Windungen liegt nach unseren Erfahrungen zwischen 4 und 24. Nach Angaben von TOMASCZEWSKI wurden bis zu 30 Windungen beobachtet. Die Windungen sind eng und steil und nehmen nach beiden Enden meist etwas an Höhe ab. Die Gleichmäßigkeit und Steilheit der Windungen sowie die Konstanz der Gestalt gelten als besondere Merkmale des Treponema pallidum. Die Tiefe einer Spirale beträgt nach NOGUCHI zwischen 0,8 und 1  $\mu$ . Fragen der Vermehrung durch transversale Teilung oder durch sog. S-Formen sind für unsere Betrachtungen von untergeordneter Bedeutung (Abb. 1).

Elektronenoptische Untersuchungen konnten über die innere Struktur des Treponema pallidum nur geringe Aufschlüsse geben. BRADFIELD und CATER beobachteten bei diesen Untersuchungen Fibrillenbündel, JAKOB berichtete über endständige knospenartige Anschwellungen (Abb. 2).

Der Durchmesser dieser Gebilde lag bei 0,4  $\mu$ . Derartige Anschwellungen an den Enden der Treponemen wurden schon früher von NOGUCHI, MEIROWSKI u. a. beobachtet. Die häufig festgestellten zarten Ausläufe bei dem Treponema pallidum wurden von SCHAUDINN als Geißeln angesehen. Nach E. HOFFMANN handelt es sich um Endfäden, deren Vorkommen er durch Maceration erklärt. Auch elektronenoptisch wurden diese Fibrillenbündel sehr häufig beobachtet und eine Erklärung gefunden, die der von E. HOFFMANN entspricht.

Über die chemische Struktur des Treponema pallidum ist bis jetzt nur wenig bekannt. Es wird vermutet, daß es zum größten Teil aus einem gramnegativen Lipoprotein besteht. Im Giemsa-Präparat färbt sich das Treponema pallidum rot. Das Treponema pallidum zeigt eine charakteristische Eigenbewegung, die sehr lebhaft sein kann. Sie besteht aus einer Rotation um die Längsachse und aus einer Knickbewegung. Nach E. HOFFMANN, MÜHLENS und MUCHA und nach unseren eigenen Erfahrungen ist die Ortsbewegung in flüssigen Medien kaum festzustellen. OELZE weist darauf hin, daß das Treponema pallidum in flüssigem Medium hilflos sei, da es von Natur aus an ein festes Substrat gebunden wäre.

Da eine Züchtung der Treponemata pallida auf künstlichen Nährböden noch nicht mit Sicherheit gelungen und vor allem nicht reproduzierbar ist, kann nur soviel gesagt werden, daß sie in dem von NELSON angegebenen Basalmedium unter streng anaeroben Bedingungen ihre Virulenz und Beweglichkeit bis zu

12 Tagen beibehalten, wie wir auch auf Grund eigener Versuche bestätigen konnten. In dem von RETTER angegebenen Nährböden (Leber in Leberbouillon) konnten wir eine Beweglichkeit des *Treponema pallidum* schon nach 14 Std nicht mehr feststellen.

Das *Treponema pallidum* ist tierpathogen. Kaninchen, Affen und Mäuse sind besonders empfängliche Versuchstiere für die syphilitische Infektion. Auch die

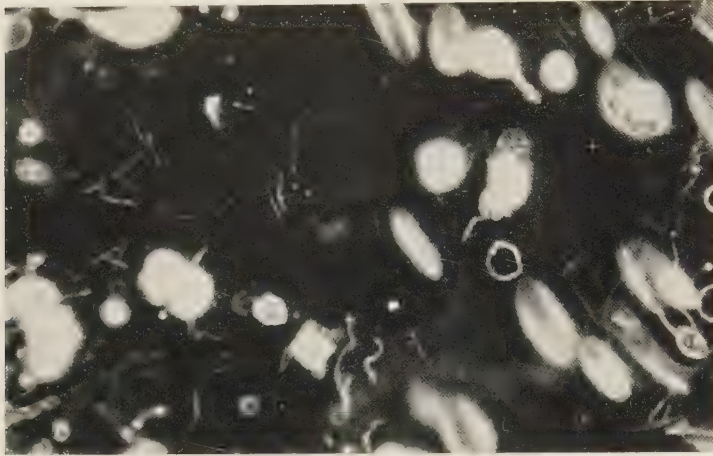


Abb. 1. Lebende *Treponemata pallida* im Dunkelfeld

Verimpfung syphilitischen Materials auf Meerschweinchen kann erfolgreich sein. Sowohl BERTARELLI, TRUFFI, E. HOFFMANN als auch KOLLE und EBERS beobachteten Primäraffekte bei Meerschweinchen. Auch die Übertragung auf Ratten gelingt, und es kommt häufig zu einer ohne manifeste Erscheinungen verlaufenden Infektion, die jedoch durch Weiterverimpfung auf Kaninchen gesichert werden kann. Nach

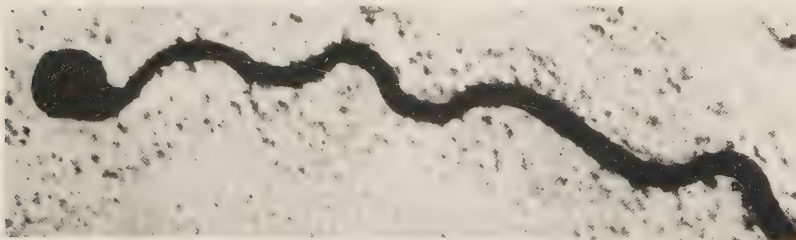


Abb. 2. *Treponema pallidum*. S-Form mit knospenartiger Anschwellung. Elektronenoptische Aufnahme von JAKOB.

JAHNEL sind auch zahlreiche andere Tiere für die syphilitische Infektion empfänglich, nicht jedoch Eichhörnchen, Zeisel, Frettchen und Murmeltiere.

Das *Treponema pallidum* wird durch spezifische Antikörper im Serum von Luikern bei Anwesenheit von Komplement immobilisiert. Durch Hitze abgetötete *Treponemata pallida* werden durch Antikörper im Serum von Syphilitikern unter bestimmten Bedingungen agglutiniert. Eine Komplementbindungsreaktion auf Lues läßt sich mit abgetöteten *Treponemata pallida* durchführen.

2. *Treponema pertenue*. Das *Treponema pertenue*, der Erreger der Frambösie, läßt sich nach vergleichenden Untersuchungen durch v. PROVAZEK morphologisch kaum vom *Treponema pallidum* unterscheiden. Es ist nach seinen Angaben etwas dicker als das *Treponema pallidum*, und die Windungen sind nicht so starr und regelmäßig. Es folgen auf tiefe teilweise

sehr flache Windungen. Die Enden sind oft haken- oder ösenartig umgebogen. Die Übertragung auf Kaninchen gelingt leicht, auch auf solche Tiere, die bereits mit Syphilis infiziert waren. Umgekehrt können auch frambösieerkrankte Tiere mit *Treponema pallidum* infiziert werden.

Eine Züchtung auf künstlichen Nährböden ist bisher nicht mit Sicherheit gelungen. Das *Treponema pertenue* behält im Basalmedium seine Beweglichkeit über 10–12 Tage bei. Es wird durch spezifische Antikörper von Luikern bei Anwesenheit von Komplement immobilisiert. Der Antikörpertiter muß jedoch höher liegen als bei dem *Treponema pallidum*. Das klinische Bild der Frambösie ist von dem der Lues zu trennen. Auch bei experimenteller Frambösie der Kaninchen bestehen nach JAHNEL, MATSUMOTO u. a. Unterschiede zur experimentellen Syphilis der Tiere.

3. *Treponema microdentium*. Das *Treponema microdentium* ist ein harmloser Saprophyt der Mundhöhle. Es ist morphologisch kaum vom *Treponema pallidum* zu unterscheiden. Die Ortsbeweglichkeit ist größer. Die Windungen behalten nicht die präformierte Starre wie beim *Treponema pallidum*. Es wächst in Serum Ascitesagar ohne Zusatz von frischem Gewebe. Das Wachstum ist durch einen üblen Geruch charakterisiert. Eine Tierpathogenität besteht nicht. Im Hoden der Kaninchen wurden nach Injektion von *Treponemata microdentia* geringe Indurationen beobachtet, die nach etwa einer Woche abklingen. Tierpassagen gelangen nicht.

4. *Treponema mucosum*. Das *Treponema mucosum* gehört ebenfalls zur Gruppe der harmlosen Kommensalen bei normalen Verhältnissen in der Mundhöhle, und ist nach den Angaben von SIEMENS mit dem *Treponema microdentium* identisch. NOGUCHI hielt jedoch eine Trennung auf Grund spezifischer Antiseren für möglich. Morphologische und kulturelle Unterschiede bestehen im Vergleich zu dem *Treponema microdentium* nicht.

5. *Treponema macrodentium*. Auch das *Treponema macrodentium* ist unter normalen Bedingungen in der Mundhöhle ein harmloser Saprophyt. Es ist größer als das *Treponema pallidum*, seine Windungen sind weniger ausgeprägt und regelmäßig. Es zeigt eine gute Ortsbewegung. Das *Treponema macrodentium* wächst in Serum-Ascitesagar nur in Gegenwart von frischem Gewebe. Ein Geruch entsteht nicht. Eine Tierpathogenität wurde nicht festgestellt.

6. *Treponema calligylum*. Das *Treponema calligylum* gehört zur Gruppe der saprophytischen Genital-spirochaetales und wächst nach NOGUCHI auf einem Nährboden, der 2 Teile neutralen Agars und 1 Teil Ascitesflüssigkeit mit Zusatz von frischem Kaninchen-nierengewebe enthält. Die Kulturen wachsen geruchlos. Morphologisch ist es bis auf eine größere Ortsbeweglichkeit als das *Treponema pallidum* und eine nicht so ausgeprägte Starre der Windungen von dem Erreger der Syphilis kaum zu unterscheiden. Eine Tierpathogenität besteht nicht.

7. *Treponema genitale*. Auch das *Treponema genitale* gehört zur Gruppe der saprophytischen Genitalspirochaetales. Es ist dem *Treponema microdentium* und *Treponema calligyrum* in der Morphologie sehr ähnlich. Es ist meist etwas kleiner als das *Treponema pallidum* und besitzt eine große Zahl von verhältnismäßig flachen, teilweise unregelmäßigen Windungen. Es zeigt gegenüber dem *Treponema pallidum* eine bessere Ortsbeweglichkeit. Es wächst auf flüssigen und festen Nährböden nur bei Zusatz von frischem Gewebe. Die Kulturen wachsen geruchlos.

Die Trennung zwischen *Treponema microdentium*, *Trep. mucosum*, *Trep. macrodentium*, *Trep. genitale* und *Trep. calligyrum* wurde von NOGUCHI mit Hilfe von Agglutinationen der Kulturspirochaetales mit den entsprechenden Kaninchenantisera durchgeföhrt. Es zeigten sich bei Kreuzversuchen wesentliche Unterschiede in der Titerhöhe.

8. *Treponema cuniculi*. Das *Treponema cuniculi* ist der Erreger der originären Kaninchenspirochätose. Es ist nach ARZT und KERL weder färberisch noch mikroskopisch vom *Treponema pallidum* zu unterscheiden. Während der Bewegungen behalten die Windungen ihre präformierte Starre bei; eine Trennung vom *Treponema pallidum* ist auch hierdurch nicht möglich. Züchtungsversuche auf künstlichen Nährböden waren bisher ohne sicheren Erfolg. Klinisch ist die Kaninchenspirochätose von der experimentellen Syphilis der Kaninchen zu trennen. Die Papeln sind flach und trocken, es kommt niemals zu harten, erbsen- bis bohngroßen Knoten wie bei echten Syphilomen. Auch eine Keratitis wurde bei der Kaninchenspirochätose nicht beobachtet. Eine Übertragung der Kaninchenspirochätose auf Menschen ist nicht möglich, wie LEVADITI, NICOLO, DANILA und STROE in Selbstversuchen bewiesen. Eine Übertragung des *Treponema cuniculi* auf Affen, Mäuse und Meerschweinchen, die von ARZT und KERL, SCHERESCHEWSKI, NOGUCHI und JACOBSTHAL u. a. versucht wurde, gelang nicht. Nach KOLLE und SCHLOSSBERGER bewirkt die Übertragung des *Treponema pallidum* auf Mäuse lediglich eine symptomlos verlaufende Erkrankung. Bei Rückimpfung von der syphilitischen Maus auf das Kaninchen ist jedoch die typische Kaninchensyphilis zu beobachten. Diese Versuche wurden von WORMS auch mit *Treponema cuniculi* durchgeföhrt. Die mit Drüsenorganbrei der vorher infizierten Mäuse beimpften Kaninchen blieben gesund. Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß eine Differenzierung zwischen *Treponema pallidum* und *Treponema cuniculi* durch Mausepassagen möglich ist. Für alle experimentellen Tierversuche mit virulenten *Treponemata pallida* ist die Berücksichtigung und Erkennung der spontanen Kaninchenspirochätose von wesentlicher Bedeutung.

9. *Borrelia refringens*. Die *Borrelia refringens* gehört zur Gruppe der apathogenen, saprophytischen Genitalspirochaetales und ist vom *Treponema pallidum* morphologisch gut zu unterscheiden. Die *Borrelia refringens* ist gröber und hat weitere, flachere Windungen. Die *Borrelia refringens* färbt sich mit Giemsa-lösung rötlich-violett und ist auch mit gewöhnlichen Farbstoffen leicht färbbar (Gentianaviolett, Carbol-fuchsin). Sie wächst in Ascitesagar ohne Gewebe-

zusatz. Ein Geruch ist bei den Kulturen nicht festzustellen. Eine Tierpathogenität besteht nicht.

Es wird in der Literatur häufig darauf hingewiesen, daß bei Untersuchungen von Reizserum aus Primäraffekten insbesondere auf die *Borrelia refringens* zu achten sei. Nach unseren Erfahrungen ist jedoch gerade die *Borrelia refringens* sehr leicht von dem *Treponema pallidum* zu unterscheiden. Sehr schwierig und verantwortungsvoll ist es jedoch, die anderen harmlosen saprophytischen Genitalspirochaetales morphologisch von virulenten *Treponemata pallida* zu trennen.

STODDARD, NOGUCHI u. a. haben versucht festzustellen, welche saprophytischen Spirochaetalesarten in der männlichen Harnröhre und im Smegma vorkom-



Abb. 3. *Borrelia refringens* und *Treponema pallidum*

men. STODDARD hat 50 gesunde Soldaten und 50 Patienten, die keine Symptome von Rückfallfieber oder Lues zeigten, untersucht. Er fand im Urin verschiedene Spirochaetalesarten. Von 50 Patienten hatten 56% saprophytische Spirochaetales, von denen 46% keine *refringens* waren. NOGUCHI fand bei 50 Soldaten in 22% saprophytische Spirochaetales in der Urethra. Von diesen Genitalspirochaetales gehörten nur 2% zur Art *Borrelia refringens* (Abb. 3).

NOGUCHI teilte die gefundenen Spirochaetales in drei Arten: 1. das *Treponema genitale* (dünner Typ), 2. das *Treponema calligyrum* (mittlerer Typ), 3. die *Borrelia refringens* (größerer Typ).

Eine Eingruppierung der Kulturtreponemen (REITER) in eine bestimmte Art der Gattung *Treponema* Schaudinn wurde bisher nicht vorgenommen.

Nach einem Überblick über die Gattung *Treponema* Schaudinn soll im folgenden auf die für die serologische Diagnostik und die Frage spezifischer Antigen-Antikörperreaktionen bedeutungsvollen Kulturtreponemen (REITER) näher eingegangen werden.

#### *Eigene Versuche mit Kulturtreponemen* (REITER) und virulenten *Treponemata pallida* (NICHOLS)

Da WASSERMANN und FICKER bei ihren Züchtungsversuchen als Ausgangsmaterial syphilitische Primäraffekte benutzten, und erst von Mischkulturen ausgehend zu einer Reinkultur dieser Spirochaetales gelangten, ist die Möglichkeit eines Überlebens der anspruchsloseren saprophytischen Genitaltreponemen auf künstlichen Nährböden wahrscheinlicher als die Möglichkeit einer Züchtung der viel anspruchsvolleren

*Treponemata pallida*. Wir konnten in eigenen Versuchen diese Kulturtreponemen (REITER) auf Leber in Leber-Bouillon-Nährböden ohne größere Schwierigkeiten züchten. Wir konnten jedoch niemals beobachten, daß virulente *Treponemata pallida* (NICHOLS), die uns in ausreichender Menge in Reinkultur aus Kaninchenhoden zur Verfügung standen, auf diesen Nährböden länger als maximal 24 Std überlebten. Das

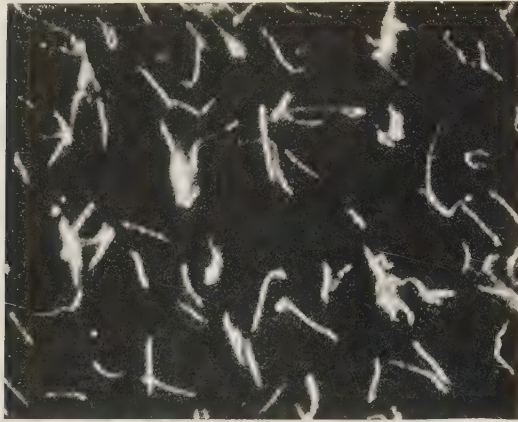


Abb. 4. Lebende Kulturtreponemen (REITER) im Dunkelfeld

von uns benutzte Ausgangsmaterial für die Züchtungsversuche enthielt keine saprophytischen Spirochaetales, so daß ein Überleben dieser Mikroorganismen bei unseren Versuchen von vornherein ausgeschlossen war.

Auch in dem von NELSON und MAYER angegebenen Basalmedium ist es trotz Einhaltung strengster anaerober Bedingungen keinem der sehr zahlreichen



Abb. 5. Kulturtreponemen (REITER). Elektronenoptische Aufnahme

Untersucher bisher gelungen, jemals eine echte Vermehrung des *Treponema pallidum* festzustellen.

EDMUND HOFFMANN stellte bei Untersuchung der Kulturspirochaetales Reiter fest, daß weder die Form noch die Zahl, Tiefe und Regelmäßigkeit der Windungen der virulenter *Treponemata pallida* entsprechen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen JAHNEL, KAST und KOLMER (Abb. 4 und 5).

Wenn wir auch die morphologischen Unterschiede nach Passagen auf künstlichen Nährböden nicht überbewerten dürfen, da nach unseren Erfahrungen die Kulturspirochaetales zumindest im tierischen Organismus morphologisch oft kaum von virulenten *Treponemata pallida* zu unterscheiden sind, so ist doch die Art der Bewegung wesentlich anders als die des Trep-

nema pallidum. Rotations- und Abknickbewegungen und vor allem die präformierte Starre der Windungen, die auch während lebhafter Eigenbewegungen erhalten bleibt, konnten wir bei den Kulturspirochaetales Reiter nicht beobachten. Nach den von NOGUCHI differenzierten Arten der Gattung *Treponema* Schaudinn gehören die Spirochaetales Reiter nicht zur Art des *Treponema microdentium* und *Trep. mucosum*, da diese Kommensalen unter starker Geruchbildung auf künstlichen Nährböden wachsen. Auch die *Borrelia refringens* zeigt zu große Unterschiede im Vergleich zu den Kulturspirochaetales Reiter, so daß eine Eingruppierung in diese Art entfällt. Das *Treponema macrodentium* scheidet voraussichtlich auch aus, da es vor allem in der Mundhöhle zu finden ist.

Differentialdiagnostisch kämen vor allem das *Treponema genitale* und das *Trep. calligyrum* in Frage. Eine Trennung oder Eingruppierung wäre nur durch Agglutinationsreaktionen mit Antiseren von Kaninchen möglich. Sowohl in morphologischer Hinsicht als auch in bezug auf das Verhalten auf künstlichen Nährböden und die fehlende Tierpathogenität zeigen die Kulturspirochaetales Reiter fast völlige Übereinstimmung mit dem *Treponema calligyrum* und dem *Trep. genitale*.

Von besonderer praktischer Bedeutung war vor allem die Frage, ob die Antikörper, die in der von GAEHTGENS angegebenen Komplementbindungsreaktion mit Kulturspirochaetales reagieren, spezifisch sind, und ferner, ob es sich bei den Kulturspirochaetales Reiter um Treponemen handelt, die dem *Treponema pallidum* biologisch sehr nahe stehen.

GAEHTGENS, BECK u. a. konnten mit Absorptionsversuchen den Nachweis der Bildung verschiedener Antikörper bzw. Reagine in menschlichen Syphilisseren führen. Wir konnten in eigenen Versuchen diese Angaben bestätigen.

Die von GAEHTGENS beschriebene Pallidareaktion mit Kulturspirochaetales Reiter findet in Deutschland und auch in anderen Ländern eine immer größere Verbreitung. Diese Reaktion ist mit Sicherheit eine Bereicherung der serologischen Diagnostik, da ein anderer Antikörper nachgewiesen wird als mit den bisher gebräuchlichen Lipoidbindungsreaktionen. Die Frage ist jetzt jedoch, ob dieser Antikörper in gleicher Weise spezifisch ist, wie der *Treponema pallidum*-immobilisierende Antikörper, der im Nelson-Test nachgewiesen wird. In eigenen tierexperimentellen Untersuchungen bemühten wir uns, eine Trennung der Kulturspirochaetales Reiter von virulenten *Treponemata pallida* durchzuführen. In der ersten Versuchsreihe prüften wir die Tierpathogenität der Kulturspirochaetales Reiter und der *Treponemata pallida* Nichols. Weiterhin untersuchten wir, welche Antikörper als Reaktion auf die Inoculation mit Treponemen im Tierorganismus entstehen würden. Die Seren aller Versuchstiere wurden vor der Inoculation in den Lipoidbindungsreaktionen, in der Pallidareaktion und im Nelson-Test untersucht. Wir fanden bis auf geringe unspezifische Schwankungen in einzelnen Flockungsreaktionen, in der Wa.R. und in der Pallidareaktion, die bei Kaninchenserum nicht selten auftreten, übereinstimmend negative Resultate.

#### 1. Tierversuche mit Kulturspirochaetales (REITER)

Den Kaninchen wurden je Hoden 1 cm<sup>3</sup> Kulturspirochaetales aufschwemmung injiziert, und zwar jeweils 0,5 cm<sup>3</sup> in den

unteren und 0,5 cm<sup>3</sup> in den oberen Pol der Testes. Je Blickfeld waren 50–70 gut bewegliche Spirochaetales in der Aufschwemmung zu sehen.

Trotz dieser großen Zahl von Kulturspirochaetales je Kubikzentimeter beobachteten wir bei keinem Tier irgendwelche Anzeichen einer syphilitischen Erkrankung, vor allem entwickelte sich in keinem Fall eine Orchitis. Auch 3 Monate nach der Infektion mit Kulturspirochaetales waren keinerlei klinische Zeichen einer Syphilis bei den Kaninchen festzustellen. Es kam bei allen Tieren zu einem Titeranstieg in der Pallidareaktion, der nach 7 Tagen einsetzte und nach 3 Wochen eine Höhe von über 500 E erreichte (Abb. 6).

Einige Wochen später beobachteten wir einen stetigen Abfall des Titers in der Pallidareaktion. Die Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin, die Meinicke-Klärungsreaktion II und die Citocholreaktion blieben bis auf unspezifische Schwankungen, die auch vor der Injektion mit Kulturspirochaetales festgestellt wurden, negativ. Der Treponema pallidum-Immobilisierungstest war bei mehrmaliger Kontrolle im Verlauf einiger Monate nach der Injektion bei allen Tieren negativ.

2. Tierversuche mit virulenten Treponemata pallida (NICHOLS)

In weiteren Tierversuchen wurden 36 Kaninchen mit virulenten Treponemata pallida (NICHOLS) intratesticular infiziert. Es wurde 1 cm<sup>3</sup> einer Aufschwemmung, die 8–10 gut bewegliche Treponemen je Blickfeld enthielt, je Hoden injiziert, und zwar 0,5 cm<sup>3</sup> in den unteren und 0,5 cm<sup>3</sup> in den oberen Pol der Testes.

7–14 Tage nach der Infektion stellten wir bei allen Tieren eine Orchitis fest. Die Testes schwellen in einzelnen Fällen bis auf das Fünffache der normalen Größe an (Abb. 7 und 8). Haarausfall, syphilitische Papeln, Keratitis und andere Zeichen der Kaninchensyphilis konnten beobachtet werden. Die serologischen Kontrollen zeigten auch bei diesen Tieren vor der Infektion, bis auf unspezifische Schwankungen in einzelnen Fällen, übereinstimmend negative Resultate. Der Nelson-Test war in allen Fällen vor der Infektion negativ. 20 Tage nach der Infektion waren alle Reaktionen bis auf vier negative Ausfälle in der Wa.R. übereinstimmend stark positiv. In allen Seren konnten nach 20–40 Tagen im Nelson-Test immobilisierende Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 9).

Das Ergebnis unserer Versuche zeigt eindeutig, daß sich nach intratestikularer Injektion von Kulturspirochaetales beim Kaninchen ausschließlich Antikörper gegen diese Mikroorganismen bilden. In keinem Fall entstanden spezifische Antikörper, die zu einer Immobilisierung virulenter Treponemata pallida geführt hätten.

GRÜNEBERG immunisierte gesunde Versuchspersonen mit sterilem Kulturspirochaetalesantigen (REITER) und beobachtete ausschließlich einen Titeranstieg in der Pallidareaktion. Bei einer gleichzeitig ausgeführten Immunisierung mit einer Kombination von Rinderautenextrakt und Pallidaantigen bei anderen Versuchspersonen fand er positive Ausfälle in der Pallidareaktion, der Wa.R. und den Flockungsreaktionen. Wir können uns jedoch den Ansichten von FROMM nicht anschließen, der daraus schließt, daß mit den von GRÜNEBERG durchgeführten Experimenten eine schlüssige Beweisführung für die Entstehung syphilitischer Blutveränderungen gelang. Wir haben zahlreiche Fälle beobachtet, in denen das Serum von gesunden Personen sowohl in der Pallidareaktion als auch in den Lipoidbindungsreaktionen unspezifisch positive Ausfälle zeigte, wie wir durch Kontrolle im Nelson-Test und klinische Untersuchungen feststellen konnten. Es kann in diesen Fällen, trotz des positiven Ausfalls in den einzelnen Reaktionen, sicher nicht von der Entstehung syphilitischer Blutveränderungen gesprochen werden. Wir möchten deshalb

sowohl den positiven Ausfall der Pallidareaktion bei Tieren, die mit Kulturspirochaetales geimpft wurden, als auch die positiven Ausfälle bei gesunden Versuchspersonen nach Immunisierung lediglich als einen Nachweis von Antikörpern gegen das entsprechende Antigen bewerten.

Unsere Ergebnisse nach der Infektion gesunder Versuchstiere mit virulenten Treponemata pallida zei-

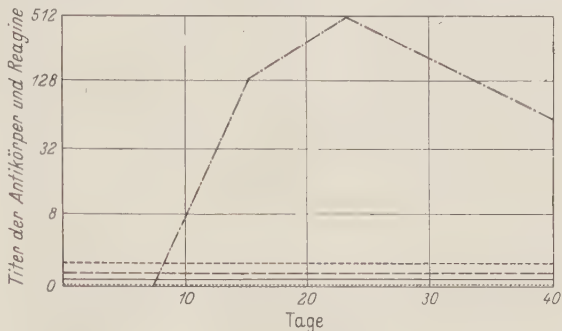


Abb. 6. Anstieg der Reagine und Antikörper nach Injektion von 1 cm<sup>3</sup> Kulturspirochaetales-Aufschwemmung je Hoden. — · — · — Spirochaetales-Eiweißreaktion; — Meinicke-Klärungsreaktion; · · · · · Citocholreaktion; — · — · — Wa.R.; — — — Nelson-Test

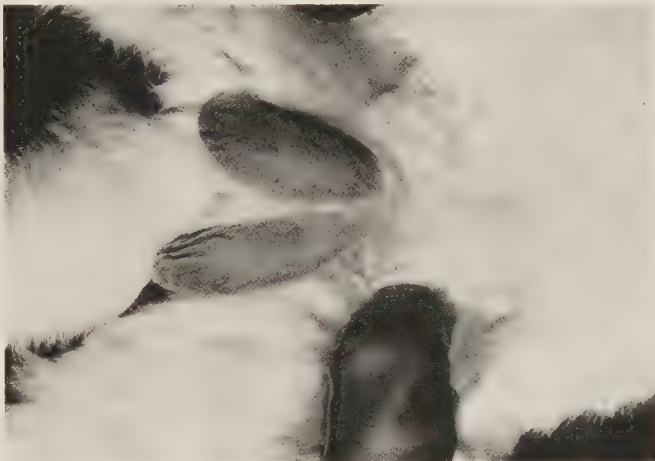


Abb. 7. Normale Kaninchenhoden vor der Infektion mit Treponema pallidum (NICHOLS)



Abb. 8. Kaninchenhoden 14 Tage nach der Infektion mit Treponema pallidum

gen im Gegensatz zu den vorhin angeführten Versuchen mit Kulturspirochaetales (REITER) einen gleichzeitigen Anstieg sowohl in den Lipoidbindungsreaktionen als auch in der Pallidareaktion und vor allem im Treponema pallidum-Immobilisierungstest. Es ist der Rückschluß berechtigt, daß die im Tierversuch beobachtete Bildung von Reaginen und Antikörpern der Entstehung syphilitischer Blutveränderungen bei Luikern



Kulturspirochaetales zu einer derartig geringen und vorübergehenden Reaginbildung geführt haben könnten. Im Nelson-Test zeigten die Tierseren vor, während und nach der Immunisierung ein negatives Resultat.

4. Immunisierungsversuche mit abgetöteten *Treponemata pallida* (NICHOLS)

**Methodik.** Virulente *Treponemata pallida* (NICHOLS) wurden aus Kaninchenhoden 8 Tage nach erfolgter Infektion der Versuchstiere gewonnen und in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Die Treponemenaufschwemmung wurde von Bestandteilen der Kaninchenhoden befreit, die Treponemen anschließend abzentrifugiert und mehrmals in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Darauf wurden die Treponemen in einer 0,3%igen Phenol-Kochsalzlösung aufgenommen. Bei Dunkelfeldkontrollen fanden sich in dieser Aufschwemmung 15–20 *Treponemata pallida* je Blickfeld. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Kulturspirochaetales enthielt das Antigen mit *Treponemata pallida* nur die Hälfte der Mikroorganismen je Kubikzentimeter. Unter sonst völlig gleichen Versuchsbedingungen wie bei der Immunisierung mit Kulturspirochaetales wurden den Kaninchen 5 cm<sup>3</sup> *Treponemata pallida*-Antigen intravenös 6mal jeden 2.–3. Tag injiziert. Als Beispiel haben wir die quantitativen Serumuntersuchungen des Kaninchens Nr. 180 in der Tabelle 3 aufgeführt. Auch bei diesen Versuchen zeigte sich praktisch eine völlige Übereinstimmung der Ergebnisse bei der Untersuchung der einzelnen Tierseren vor, während und nach der Immunisierung.

Ergebnisse

Die „Pallida“-Reaktion zeigte 7 Tage nach Beginn der Injektionen einen Titeranstieg bis zur Serumverdünnung 1:40, nach 17 Tagen bis zur Serumverdünnung 1:80, nach 21 Tagen beobachteten wir einen Titerabfall bis zur Serumverdünnung 1:40, und nach 35 Tagen, also 3 Wochen nach Beendigung der Injektionen, bis zur Serumverdünnung von 1:20. Die Flockungsreaktionen Meinicke-Klärungs- und Citocholreaktion zeigten nach 7 Tagen keinen deutlichen Titeranstieg, nach 17 Tagen waren beide Reaktionen bis zu einer Verdünnung von 1:8 vierfach positiv, nach 21 Tagen war der Titer bis zu 4 Einheiten abgesunken, nach 35 Tagen waren die Ergebnisse in diesen Reaktionen negativ bzw. ein- bis zweifach positiv. Die Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin zeigte nach 7 Tagen einen Anstieg bis vierfach positiv, nach 17 Tagen lag der Titerwert bei 1:20, nach 21 Tagen bei 1:10 und nach 35 Tagen war die Wa.R. negativ oder einfach positiv. Der Nelson-Test war nach 7 Tagen noch negativ, auch nach 17 Tagen erhielten wir einen negativen Befund. Nach 21 und 35 Tagen reagierten die Tierseren im *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest übereinstimmend positiv.

Aus unseren Versuchen ergibt sich, daß eine eindeutige serologische Trennung der Kulturspirochaetales vom *Treponema pallidum* durch Immunisierung von Kaninchen möglich ist. Der isoliert starke Anstieg des serologischen Titers in der „Pallida“-Reaktion zeigt an, daß die antigene Struktur dieser saprophytischen Spirochaetales nicht mit der virulenter Treponemen übereinstimmt. Die Beobachtung, daß nach Immunisierung mit *Treponemata pallida* ein Titeranstieg in den verschiedenen Lipoidbindungsreaktionen, der „Pallida“-Reaktion und im Nelson-Test festzustellen war, zeigt, daß die Antigenstruktur virulenter Treponemen sowohl zur Bildung von spezifischen Antikörpern, als auch zur Bildung von Reaginen und Spirochaetalesantikörpern führt.

5. Reaktion der Kulturspirochaetales im Nelson-Test. Zur weiteren Differenzierung der verschiedenen Treponemenarten benutzten wir den Nachweis *Treponema pallidum*-immobilisierender Antikörper im Nelson-Test. Mit Hilfe der im folgenden beschriebenen Versuche soll zu der Frage Stellung genommen werden, ob eine Antigen-Antikörperreaktion zwischen Kulturspirochaetales und spezifischen Antikörpern im Serum von Luikern möglich ist.

Auf Reiter-Nährböden gezüchtete Kulturspirochaetales wurden in das von NELSON und MAYER angegebene Basalmmedium verbracht. Entsprechend der Versuchsanordnung mit virulenten Treponemen waren je Blickfeld etwa 8 Kulturspirochaetales sichtbar. Die Patientenseren (jeweils 0,05 cm<sup>3</sup>) wurden in Röhrchen von 8 cm Länge und 0,5 cm lichter Weite verbracht und dazu 0,15 cm<sup>3</sup> Komplement und 0,35 cm<sup>3</sup> Kulturspirochaetalesaufschwemmung gegeben.

Die Seren von unbehandelten Lues II- und Lues latens-Patienten waren vorher im *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest untersucht worden und zeigten in Übereinstimmung mit dem klinischen Bild und den anamnestischen Angaben in allen Fällen eine Immobilisierung virulenter Treponemen durch im Serum vorhandene spezifische Antikörper. Die Kulturspirochaetales (REITER) wurden in keinem Fall durch die mit Sicherheit im Serum vorhandenen spezifischen Antikörper immobilisiert.

6. Diskussion. Es zeigte sich bei der Inoculation lebender Spirochaetales, daß im Tierorganismus keine Lipoidreagine gebildet wurden. Bei dieser Versuchsanordnung war die Mitwirkung von Lipoidsubstanzen aus den Nährböden, die bei der Immunisierung mit abgetöteten Spirochaetales und *Treponemata pallida* eine Rolle gespielt haben könnte, praktisch ausgeschlossen, da nur einmal je 1 cm<sup>3</sup> einer sehr spirochaetalesreichen bzw. *Treponemata pallidum* enthaltenden Aufschwemmung je Hoden gespritzt wurde. Bei den Immunisierungsversuchen wurden 6mal 5 cm<sup>3</sup> einer

Tabelle 3. Anstieg der Antikörper und Reagine nach Immunisierung von Kaninchen mit *Treponemata pallida* (NICHOLS)

| Serum-titer | Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin<br>Tag nach der Infektion |    |     |     |     | M.K.R. II<br>Tag nach der Infektion |    |     |     |     | Citochol-R.<br>Tag nach der Infektion |    |     |     |     | „Pallida“-R. S.E.R.<br>Tag nach der Infektion |    |     |     |     | Nelson-Test<br>Tag nach der Infektion |    |     |     |     |
|-------------|---------------------------------------------------------------|----|-----|-----|-----|-------------------------------------|----|-----|-----|-----|---------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----------------------------------------------|----|-----|-----|-----|---------------------------------------|----|-----|-----|-----|
|             | 1.                                                            | 7. | 17. | 21. | 35. | 1.                                  | 7. | 17. | 21. | 35. | 1.                                    | 7. | 17. | 21. | 35. | 1.                                            | 7. | 17. | 21. | 35. | 1.                                    | 7. | 17. | 21. | 35. |
| 1:4         | —                                                             | ++ | ++  | ++  | —   | —                                   | —  | ++  | ++  | —   | —                                     | —  | ++  | ++  | +   | —                                             | ++ | ++  | ++  | ++  | —                                     | —  | —   | ++  | ++  |
| 1:8         | —                                                             | —  | ++  | ++  | —   | —                                   | —  | ++  | —   | —   | —                                     | —  | ++  | —   | —   | —                                             | ++ | ++  | ++  | ++  | —                                     | —  | —   | ++  | ++  |
| 1:10        | —                                                             | —  | ++  | ++  | —   | —                                   | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | —   | —                                             | ++ | ++  | ++  | ++  | —                                     | —  | —   | ++  | ++  |
| 1:20        | —                                                             | —  | ++  | —   | —   | —                                   | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | —   | —                                             | ++ | ++  | ++  | ++  | —                                     | —  | —   | ++  | ++  |
| 1:40        | —                                                             | —  | —   | —   | —   | —                                   | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | —   | —                                             | ++ | ++  | ++  | —   | —                                     | —  | —   | ++  | ++  |
| 1:80        | —                                                             | —  | —   | —   | —   | —                                   | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | —   | —                                             | —  | ++  | —   | —   | —                                     | —  | —   | ++  | ++  |
| 1:160       | —                                                             | —  | —   | —   | —   | —                                   | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | —   | —                                             | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | ++  | ++  |
| 1:320       | —                                                             | —  | —   | —   | —   | —                                   | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | —   | —                                             | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | ++  | ++  |
| 1:640       | —                                                             | —  | —   | —   | —   | —                                   | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | —   | —                                             | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | ++  |
| 1:1280      | —                                                             | —  | —   | —   | —   | —                                   | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | —   | —                                             | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | ++  |
| 1:2560      | —                                                             | —  | —   | —   | —   | —                                   | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | —   | —                                             | —  | —   | —   | —   | —                                     | —  | —   | —   | —   |

zwar sorgfältig gereinigten, aber noch eventuell Lipide aus den Nährböden bzw. Kaninchenhoden enthaltenen Aufschwemmung intravenös injiziert, so daß möglicherweise noch das Lipoidhaptin zusammen mit den Vollantigenen (Spirochätenprotein) zur Bildung von Lipoidreaginen, zumindest in der Wa.R., geführt haben könnte.

Bei unseren Versuchen stellten wir weiterhin fest, daß es zwar nach Immunisierung mit abgetöteten *Treponemata pallida* auch zu einer Bildung von Antikörpern gegen Spirochaetales kommen kann, daß jedoch im Gegensatz hierzu nach Immunisierung mit Kulturspirochaetales in keinem Fall spezifische, gegen das *Treponema pallidum* gerichtete Antikörper gebildet wurden. Somit glauben wir, in der Differenzierung der Kulturspirochaetales von den *Treponemata pallida* einen Schritt weitergekommen zu sein. Eine enge biologische Verwandtschaft zwischen Kulturspirochaetales und dem *Treponema pallidum*, wie sie von GAETGENS, FÜHNER, FROMM u. a. angenommen wird, besteht unseres Erachtens nicht. Diese enge Verwandtschaft besteht jedoch nach den Angaben von NELSON zwischen dem *Treponema pallidum*, dem *Trep. pertenue* und dem *Trep. cuniculi*. Nach Versuchen, die NELSON, MAGNUSON u. a. durchführten, wurde festgestellt, daß bei der Infektion von Kaninchen mit *Treponema pallidum* immobilisierende Antikörper entstehen, die sowohl das *Treponema pallidum* als auch das *Trep. pertenue* und das *Trep. cuniculi* immobilisieren. Ebenso bilden sich nach Infektion mit *Trep. pertenue* bzw. *Trep. cuniculi* Immobiline, die die anderen beiden Treponemenarten gleichfalls immobilisieren. Eine Trennung der einzelnen Treponemen wurde in ähnlicher Weise durchgeführt, wie sie von NOGUCHI bei der Differenzierung der saprophytischen Genitalspirochaetales beschrieben wurde, d. h. Unterschiede in der Titerhöhe nach Infektion bzw. Immobilisierung ermöglichten eine Trennung zwischen *Trep. pallidum*, *Trep. pertenue* und *Trep. cuniculi*. Diese drei Arten der Gattung *Treponema* Schaudinn sind tierpathogen und nicht mit Sicherheit auf künstlichen Nährböden züchtbar. Auch hierin zeigt sich die enge biologische Verwandtschaft. Wenn man schon an eine auffällige Veränderung ursprünglich virulenter Treponemen durch langjährige Kulturpassagen denken will, so bleibt es doch unerklärlich, daß auch eine völlige Umwandlung der antigenen Struktur eingetreten ist. Auf Grund der oben angegebenen Unterscheidungsmerkmale und der von uns durchgeführten tierexperimentellen Versuche ist eine Übereinstimmung zwischen Kulturspirochaetales und virulenten *Treponemata pallida* in keinem der fünf von HENRICI geforderten Punkte gegeben. HENRICI gibt an, daß zwei Mikroorganismen derselben Art angehören, wenn sie sich 1. in der Morphologie, 2. in der Biochemie, 3. in der Anpassung an den Nährboden, 4. in der Pathogenität für Tiere, 5. in den serologischen Reaktionen ähnlich sind.

**Zu Punkt 1.** Es sind in der Morphologie der von WASSERMANN und FICKER angelegten und von REITER weitergezüchteten Kulturspirochaetales im Vergleich zu virulenten *Treponemata pallida* nach EDUARD HOFFMANN, JAHNEL, KAST und KOLMER und unseren eigenen Beobachtungen eindeutige Unterschiede festzustellen. Die Art der Beweglichkeit der Kulturspirochaetales ist deutlich von den Bewegungen virulenter Treponemen zu unterscheiden.

**Zu Punkt 2.** Nach ZUELZER und SCHUMACHER sind auch im biochemischen Verhalten deutliche Unterschiede zwischen den Kulturspirochaetales und den virulenten *Treponemata pallida* festzustellen.

**Zu Punkt 3.** Ein Vergleich der Anpassung an den Nährboden ist wegen der Unmöglichkeit einer Kultur des *Treponema pallidum* auf künstlichen Nährböden bisher nicht durchführbar. Auf Grund der Untersuchungen von NOGUCHI über Kulturspirochaetales stimmen die Spirochaetales (REITER) in bezug auf eine Anpassung an den Nährboden weitgehend mit den saprophytischen Genitalspirochaetales *Trep. calligyrum* und *Trep. genitale* überein.

**Zu Punkt 4.** Auch in der Tierpathogenität bestehen grundlegende Unterschiede zwischen Kulturspirochaetales (REITER) und *Treponemata pallida*. Die saprophytischen Spirochaetales sind, wie wir auf Grund eigener Versuche beweisen konnten, apathogen. Es gelang uns niemals, mit Spirochaetales (REITER) bei Kaninchen eine Syphilis zu erzeugen.

**Zu Punkt 5.** Bei einem Vergleich des serologischen Verhaltens der Kulturspirochaetales und der *Treponemata pallida* stellten wir folgendes fest: Mit Kulturspirochaetales immunisierte bzw. inoculierte Kaninchen bildeten keine spezifischen Antikörper, die die *Treponemata pallida* immobilisierten. Versuchstiere, die mit *Treponemata pallida* infiziert wurden, bildeten spezifische Antikörper, Lipoidreagine und Spirochaetales-Eiweißantikörper.

Es ist somit heute eine eindeutige Trennung der Kulturtreponemen (REITER) von virulenten *Treponemata pallida* sowohl tierexperimentell als auch serologisch durchführbar.

**Zusammenfassung.** Die Einteilung der Ordnung Spirochaetales nach BERGEY wird besprochen und anschließend auf die Morphologie und Biologie der verschiedenen Arten der Gattung *Treponema* Schaudinn näher eingegangen. Es wird festgestellt, daß die Kulturtreponemen (REITER) sowohl in morphologischer und biochemischer Hinsicht als auch in bezug auf das Verhalten auf künstlichen Nährböden und die fehlende Tierpathogenität weitgehende Übereinstimmung mit dem *Treponema calligyrum* und *Treponema genitale* zeigen. Die Ergebnisse eigener tierexperimenteller und serologischer Untersuchungen zur Trennung der Kulturtreponemen (REITER) von virulenten *Treponemata pallida* werden beschrieben und diskutiert. Es zeigt sich, daß bei intratestikulären Injektionen von Kulturtreponemen in vivo ausschließlich Antikörper gegen diese Mikroorganismen gebildet werden. Spezifische Antikörper, die zur Immobilisierung virulenter Treponemen geführt hätten, werden nicht gebildet. Nach Infektion gesunder Kaninchen mit virulenten *Treponemata pallida* bilden sich in vivo Lipoidreagine, Antikörper gegen Kulturtreponemen und spezifische, *Treponemata pallida* immobilisierende Antikörper. Bei Immunisierung von Kaninchen mit Aufschwemmungen abgetöteter Kulturtreponemen sind im Serum der Tiere Antikörper gegen das benutzte Antigen bis zum Titer von 1:640 nachweisbar. Auch bei diesen Versuchen kommt es nicht zu einer Bildung von spezifischen Antikörpern. Die zur Kontrolle durchgeführte Immunisierung mit abgetöteten *Treponemata pallida* (NICHOLS) führte in vivo zur Bildung von spezifischen Antikörpern bis zu einem Titer von 1:1280. Gleichfalls waren Treponemen-Proteinantikörper und Lipoid-

reagine nach der Immunisierung festzustellen. Im Nelson-Test wurden Kulturtreponemen durch spezifische Antikörper nicht immobilisiert. Abschließend wird festgestellt, daß die Kulturtreponemen (REITER) in keinem der 5 Punkte HENRICIS mit virulenten Treponemata pallida übereinstimmen, und daß diese apathogenen Treponemen somit nicht zur Art des Treponema pallidum gehören. Die Ergebnisse unserer Versuche zeigen, daß eine eindeutige serologische Trennung der Kulturtreponemen vom Treponema pallidum möglich ist, und daß demzufolge auch die antigene Struktur dieser saprophytischen Treponemen nicht mit der virulenter Treponemen (Trep. pallidum, Trep. pertenue, Trep. cuniculi) übereinstimmt.

**Literatur.** ARISTOWSKY, W., u. R. HOLTZER: Klin. Wschr. 1925, 2016. — ARZT, L., u. W. KERL: Wien. klin. Wschr. 1914, 1053. — Dermat. Z. 29, 1 (1920). — BERGEY, D. H.: J. Bacter. 3, 542 (1918). — BERTARELLI, E.: Zbl. Bakter. I Orig. 43, 167, 448 (1907). — BERTARELLI, E., u. G. VOLPINO: Zbl. Bakter. I Orig. 40, 238 (1906); 41, 473 (1906). — BRADFIELD, K., and R. CATER: Nature (Lond.) 169, 944 (1952). — BREED, R. S.: J. Bacter. 3, 542 (1918). — BRUMPT, E.: Précis de parasitologie, 6. Aufl., 1 u. 2. Paris: Masson & Cie. 1949. — D'ALESSANDRO, G., e V. A. PUCCINELLI: Giorn. med. Italia 1, 68 (1944). — DANILA, P., et R. STROE: C. r. Soc. Biol. Paris 74, 912 (1913); 77, 167 (1914). — DOLEIN, F.: Probleme der Protistenkunde, Bd. II. Jena 1911. — EITNER, E.: Münch. med. Wschr. 1907, 770. — FONTANA, A.: Dermat. Wschr. 1914, 1367. — FROMM, G.: Hautarzt 2, 145 (1951); 5, 543 (1954); 6, 20 (1955). — Ärtzl. Wschr.

1954, 639. — FÜHNER, F.: Ref. Hamburger Ärztebl. 1952, 216. — Ärtzl. Wschr. 1952, 644. — FÜHNER, F., u. W. GAEHTGENS: Z. Hyg. 138, 573 (1954). — GAEHTGENS, W.: Med. Klin. 1929, 390. — Z. Immun.forsch. 63, 398 (1929); 73, 527 (1932). — Urologic. Rev. 34, 165 (1930). — Zbl. Bakter. I Orig. 26, 118 (1930). — Med. Welt 1932, 765. — Arch. of Dermat. 42, 176 (1937). — GAEHTGENS, W., u. L. OTTO: Med. Klin. 1929, 873. — HAEINSELL, P.: Arch. vergl. Ophthalm. 27, 93 (1881). — HARDY, K.: Zit. BRUCK, Serodiagnose 1924, 318. — HENRICI, A. T.: The Biology of Bacteria. 1948. — HITCHENS, E.: J. Bacter. 3, 542 (1918). — KAST, C. C., and J. A. KOLMER: Amer. J. Syph. 32, 421 (1929). — KOLLE, W., u. H. HETSCH: Experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1942. — KOLLE, W., u. H. SCHLOSSBERGER: Dtsch. med. Wschr. 1926, 316. — MATSUMOTO, H., Y. ADACHI u. M. TRUFFI: Acta dermat. (Kioto) 2, 193 (1924). — MEINICKE, K.: Arch. f. Dermat. 200, 536 (1955). — Fortschritte der praktischen Dermatologie, S. 257. Berlin: Springer 1955. — Hautarzt 1956. — NELSON, R. A.: Amer. J. Hyg. 1948, 120. — NELSON, R. A., and M. M. MAYER: J. of Exper. Med. 89, 369 (1949). — NICHOLS, H. J.: J. of Exper. Med. 19, 362 (1917). — NOGUCHI, H.: J. of Exper. Med. 14, 99 (1911); 15, 201 (1912); 1917, 14, 99; 1918, 27, 575. — Münch. med. Wschr. 1912, 466. — Ann. Inst. Pasteur 30, 1 (1916). — PROWAZEK, S. v.: Arb. ksl. Gesdh.amt 1907, 26. — REITER, H.: Dtsch. med. Wschr. 1925, 303. — Klin. Wschr. 1926, 444. — SCHAUDINN, F.: Dtsch. med. Wschr. 1905, 1665. — SCHAUDINN, F., u. E. HOFFMANN: Arb. ksl. Gesdh.amt 22, 528 (1905). — WORMS, W.: Z. klin. Med. 1923, 99. — Zbl. Hautkrkh. 27, 209 (1925). — Arch. f. Dermat. 151, 331 (1926).

*Anschrift:* Priv.-Doz. Dr. K. MEINICKE, München 15, Frauenlobstr. 9, Dermatologische Universitätsklinik



Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. A. MARCHIONINI)

## Antigen-Antikörperreaktionen mit apathogenen und virulenten Treponemen\*

Von KURT MEINICKE

Mit 1 Textabbildung

Seit der Entdeckung des Erregers der Lues durch SCHAUDINN und E. HOFFMANN im Jahre 1905 war es das Bestreben der Serologen und Bakteriologen, spezifische Reaktionen zur serologischen Diagnostik der Lues zu entwickeln. Das Ziel, *Treponemata pallida* für diese Reaktionen als Antigen zu benutzen, konnte jedoch erst in den letzten Jahren durch die Arbeiten von NELSON und MAYER erreicht werden. Die diffizile Methodik und der große Arbeitsaufwand des *Treponema pallidum*-Immobilisierungstests verhindern vorerst die Anwendung dieser ersten spezifischen Reaktion auf breiterer Basis.

Es ist das Verdienst von GAEHTGENS, im Jahre 1929 als erster eine *Komplement-Bindungsreaktion mit Kulturtreponemen* entwickelt zu haben. In der damaligen Zeit war die Frage noch ungeklärt, ob es sich hierbei um apathogene *Treponemata pallida* oder um saprophytische Kulturtreponemen (*Spirochaetales*) handelte, die nicht mit dem Erreger der Syphilis identisch waren. Der besondere Wert dieser Reaktion von GAEHTGENS liegt darin, daß es gelingt, mit dem Antigen aus Kulturtreponemen einen anderen Antikörper nachzuweisen als mit den bisher gebräuchlichen Lipoid-Bindungsreaktionen.

GAEHTGENS arbeitet in seiner Komplement-Bindungsreaktion mit einer Kultur-Treponemensuspension in wäßrigem, carbolhaltigem Milieu. Wir haben an anderer Stelle unsere Versuche beschrieben, die zeigten, daß diese züchtbaren, apathogenen *Spirochaetales* in keinem der von HENRICI geforderten 5 Punkte mit virulenten *Treponemata pallida* übereinstimmen. Auf Grund unserer Experimente und der Versuche von NELSON halten wir eine Bezeichnung „Pallida“-Reaktion für eine Komplement-Bindungsreaktion mit saprophytischen Treponemen für wissenschaftlich nicht begründet. Wir schlugen deshalb vor, diese Reaktion „*Spirochaetales-Eiweißreaktion*“ (S.E.R.) oder „*Treponemen-Proteinreaktion*“ (T.P.R.) zu nennen. Da es seit einigen Jahren auf Grund der Arbeiten von NELSON und MAYER, HARDY, McLEOD, MAGNUSON und unserer eigenen Versuche möglich ist, spezifische Antigen-Antikörperreaktionen bei Lues durchzuführen, erscheint die Beibehaltung der Bezeichnung „Pallida“-Reaktion für Reaktionen mit Kulturtreponemen verwirrend. Wir haben darauf hingewiesen, daß es uns trotz zahlreicher Versuche nicht gelungen ist, mit einem Antigen aus Reiter-Treponemen echte, *Treponema pallidum*-immobilisierende Antikörper beim Tier zu erzeugen. Andererseits werden die Kulturtreponemen (REITER) nicht durch

spezifische Antikörper immobilisiert. Die Kulturtreponemensubstanz stellt jedoch ein Vollantigen von komplexer Struktur dar, wobei den Lipoidanteilen nur eine geringe Bedeutung zukommt, so daß wir von Treponemen-Protein- bzw. *Spirochaetales*-Eiweiß-Antikörpern sprechen können.

### *Antigen-Antikörperreaktionen mit Kulturspirochaetales* (REITER)

Es ist das Verdienst von D'ALLESSANDRO, PUCCELLI und ihren Mitarbeitern, eine Aufschlüsselung der Antigenstruktur apathogener Kulturtreponemen durchgeführt zu haben. Sie fanden vier verschiedene antigene Anteile, und zwar handelt es sich 1. um ein thermolabiles Proteinantigen; 2. um ein thermostabiles Polysaccharidantigen; 3. um ein Lipoidantigen, das serologisch mit den alkoholischen Gewebslipoiden identisch sein soll, und einen flockenden sowie einen Komplement-ablenkenden Antikörper hervorruft; 4. um ein Lipoidantigen, das den Lipoiden aus Gehirnsubstanz ähnlich ist.

Die Annahme von PUCCELLI, daß eine Identität in der Antigenstruktur oder zumindest eine enge Verwandtschaft zwischen apathogenen Treponemen und virulenten *Treponemata pallida* besteht, konnte bis heute noch in keinem Punkt wissenschaftlich exakt bewiesen werden. Die Frage kann deshalb noch nicht beantwortet werden, ob das Protein saprophytischer *Spirochaetales* (Treponemen) und die Lipide möglicherweise Teile der Antigenstruktur des *Treponema pallidum* sind.

Eine genaue Trennung und exakte Bezeichnung der verschiedenen Antikörper und Reagine, die wir im Serum von Luikern nachweisen können, ist in der modernen Luesserologie unumgänglich. PUCCELLI trennte „diagnostische Antikörper und Reagine“ von „immunologischen Antikörpern“. Unter diagnostischen Reaginen und Antikörpern verstand er 1. die *Lipoidreagine*, die wir in den Lipoid-Bindungsreaktionen (Wassermann-, Meinicke-Klärungs-, Citochol-, Kahn-Reaktionen usw.) nachweisen können; 2. die *Spirochaetales-Eiweiß- bzw. Treponemen-Proteinantikörper*, die wir mit Hilfe der Kulturspirochaetales in der Komplement-Bindungs- und Agglutinationsreaktion (GAEHTGENS, ROEMER) nachweisen können.

Als *Immun-Antikörper* bezeichnete er Antikörper, die in der Lage sind, in vivo und in vitro eine sichtbare oder nachweisbare Reaktion mit *Treponema pallidum* herbeizuführen (Agglutinine, Treponemolysine, immobilisierende Antikörper usw.). In den USA und in Frankreich hat sich heute schon für die Charakterisierung der bisher üblichen Reaktionen Wa.R.,

\* Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür ihr auch an dieser Stelle nochmals gedankt sei.

MKR II, Kahn-, Citocholreaktionen usw. der Begriff „Klassische Reaktionen“ eingebürgert. Die in diesen Lipoid-Bindungsreaktionen nachgewiesenen wirksamen Faktoren werden als „Reagine“ bezeichnet. Auch Cardiolipin und Sitolipin gehören eindeutig in diese Gruppe. Es handelt sich hierbei ja lediglich um besonders gereinigte Antigensubstanzen, die beim Cardiolipin aus Rinderherzen, und beim Sitolipin aus Weizenkeimlingen gewonnen werden. Die sog. „Pallida“-Reaktion von GAEHTGENS, die nach unserem Vorschlag heute schon von zahlreichen Autoren als Spirochaetales-Eiweißreaktion (S.E.R.) bezeichnet wird, ist von den klassischen Reaktionen zu trennen. Wir haben die Bezeichnung Spirochaetales-Eiweißreaktion deshalb gewählt, weil wir bis heute noch nicht wissen, zu welcher Gattung und Art der Spirochaetales die apathogenen Kulturspirochaetales gehören, die in der „Pallida“-Reaktion benutzt werden.

Die von ROEMER angegebene Reaktion mit Kulturspirochaetales (REITER) ist unter dem Namen „Spirochaeten-Agglutinationsreaktion“ eingeführt worden. Nach BERGEY werden als Spirochäten lediglich die Arten bezeichnet, die zur Gattung Spirochaeta Ehrenburg und zur Familie Spirochaetaceae gehören. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die Kulturspirochaetales (REITER) zu den Arten der Gattung Treponema Schaudinn und zur Familie Treponemataceae gehören. Sowohl die Familie der Spirochaetaceae als auch die der Treponemataceae gehören zur Ordnung der Spirochaetales, so daß bis zu einer endgültigen Einteilung der Kulturspirochaetales (REITER) in die entsprechende Art und Gattung auch hier die Bezeichnung Spirochaetales-Agglutinationsreaktion weniger präjudizierend gewesen wäre.

Neben den Lipoid-Bindungs- und den Spirochaetalesreaktionen wird man voraussichtlich in der Luesserologie von echten Pallidareaktionen sprechen müssen, so vom Treponema pallidum-Immobilisierungstest, von dem Immun-Adhärenzphänomen mit Trep. pall., der Komplement-Bindungsreaktion und eventuell auch von Flockungsreaktionen mit Trep. pall.

Mit Sicherheit können wir also heute in der serologischen Diagnostik der Lues drei voneinander völlig verschiedene Reagine bzw. Antikörper nachweisen: 1. Lipidreagine; 2. Spirochaetales-Eiweißantikörper, 3. spezifische, gegen das Treponema pallidum gerichtete Antikörper.

Das serologische Gesamtbild, wie es von FÜHNER 1952 aufgestellt wurde, ist heute sicherlich nicht mehr vertretbar. Dieses serologische Gesamtbild, in das FÜHNER die Lipoid-Bindungsreaktionen und die Spirochaetales-Eiweißreaktion einfügte, ist unvollständig, wenn nicht auch der Treponema pallidum-Immobilisierungstest und andere spezifische Reaktionen darin enthalten sind.

a) *Komplement-Bindungsreaktion* (GAEHTGENS). Auf die Technik der Komplement-Bindungsreaktion von GAEHTGENS soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden, da diese Methode allgemein bekannt ist und seit vielen Jahren in Deutschland und auch im Ausland routinemäßig angewandt wird. Auf Grund 4jähriger eigener Erfahrung möchten wir die S.E.R. in der serologischen Diagnostik nicht missen, da sie uns in vielen Fällen einen Hinweis auf das Vorliegen einer Lues geben kann. Wir meinen hiermit besonders diejenigen Fälle, bei denen die Spirochaetales-Eiweiß-

reaktion isoliert positiv ausfällt. Wir dürfen diesen Hinweis jedoch niemals als die Bestätigung unserer Verdachtsdiagnose auffassen, da wir auch bei einem Teil dieser Fälle feststellen mußten, daß es sich um isoliert unspezifisch positive Ausfälle in der S.E.R. handelte. Wir fanden jedoch auch zahlreiche Fälle, in denen uns die isoliert positive Meinicke-Klärungsreaktion II, die Citocholreaktion und auch die Kolmer-Komplement-Bindungsreaktion einen wichtigen Hinweis auf das Vorliegen einer luischen Erkrankung gaben, obwohl die S.E.R. in diesen Fällen negativ war. Eine Bestätigung dieser hinweisenden Befunde ist heute durch spezifische Treponemen-Antigen-Antikörperreaktionen möglich.

b) *Agglutinationsreaktion* (ROEMER). Von ROEMER wurde eine Agglutinationsreaktion bei Lues mit einem Spirochaetalesantigen der Behring-Werke angegeben. Es handelt sich bei diesem Antigen um eine wäßrige Lösung apathogener Kulturspirochaetales (REITER), ähnlich wie sie in der S.E.R. verwendet wird. Diese Agglutinationsreaktion wurde in erster Linie zur Untersuchung von Liquores ausgearbeitet. ROEMER wies darauf hin, daß die Spirochaetales-Agglutinationsreaktion mit Liquor gegenüber einer Komplement-Bindungsreaktion als besonderen Vorteil die größere Einfachheit der technischen Ausführung besitzt. Es handelt sich also auch bei dieser Reaktion nicht um eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion auf Lues. ROEMER fand, daß die Sensibilität der Spirochaetales-Agglutinationsreaktion zwar größer als die der Wa.R., jedoch um etwas geringer ist, als die der M.K.R. II. Die unspezifischen Reaktionen betragen nach ROEMER und SCHLIPKÖTER etwa 1% der Gesamtzahl der untersuchten Seren.

*Technik.* 0,4 cm<sup>3</sup> des Liquors werden ohne vorherige Inaktivierung in Präcipitationsröhrchen mit einem inneren Durchmesser von etwa 5 mm eingefüllt. In ein Kontrollröhrchen pipettiert man statt der Lumbalflüssigkeit 0,4 cm<sup>3</sup> sterile Kochsalzlösung 0,9% (pH 7). In jedes Röhrchen pipettiert man dann 2 Tropfen = 0,08 cm<sup>3</sup> des Spirochaetalesantigens. Die Röhrchen werden anschließend kräftig geschüttelt und für 3 Std im Brutschrank bei 37° C gehalten. Die weitere Aufbewahrung erfolgt bei Zimmertemperatur bis zum nächsten Tag. Die Ablesung wird nach 3 Std und am folgenden Tag vorgenommen. Der Ausfall der Reaktion wird makroskopisch nach dem Grad der Klärung und der Stärke der Ausflockung beurteilt. In negativen Fällen ist eine diffuse Trübung im Liquor-Antigengemisch festzustellen, im schwach positiven Fall feinflockige Aggregate bei leicht getrübbter Flüssigkeit. Stark positive Reaktionen zeigen deutlich sichtbare Flocken und Klärung der überstehenden Flüssigkeit.

Auch im Serum läßt sich die Agglutinationsprobe durchführen. Aktive Seren werden benutzt, die mit neutraler physiologischer NaCl-Lösung 1:50 verdünnt werden. Zu 0,4 cm<sup>3</sup> Serumverdünnung werden 2 Tropfen Antigen hinzugefügt und das Gemisch gut geschüttelt. Die Ablesung erfolgt nach 3 Std Brutschrankaufenthalt.

#### *Antigen-Antikörperreaktionen mit Treponemata pallida* (NICHOLS)

NICHOLS gelang es, mit dem Liquor eines Patienten, bei dem nach Salvarsan-Wismutbehandlung ein Neurorezidiv aufgetreten war, Treponemata pallida auf Kaninchen zu übertragen. Dieser im Jahre 1913 auf Kaninchenhoden übertragene Treponemenstamm wird auch heute noch ganz allgemein für die Treponemenforschung in allen Ländern der Welt benutzt. Die Treponemen sind von der damaligen Zeit bis heute ununterbrochen in Tierpassagen gehalten worden. Die Virulenz der von NICHOLS auf Tiere übertragenen

wurde von zahlreichen Untersuchern recht unterschiedlich beurteilt. So sah z. B. JAHNEL erst 5 bis 6 Wochen nach der Überimpfung auf Kaninchenhoden in 30—50% einen Primäraffekt; eine vorausgehende Orchitis wurde von ihm bei ungefähr der gleichen Zahl der Tiere beobachtet. JAHNEL hatte frühestens fünf Wochen nach der Inoculation von *Treponemata pallida* (NICHOLS) in Kaninchenhoden eine Weiterimpfung auf gesunde Tiere vorgenommen. Er konnte auch praktisch keinen früheren Zeitpunkt wählen, da vorher bei Durchmusterung des Gewebsbreies von Kaninchenhoden keine Treponemen, oder zumindest nur ganz vereinzelt, zu finden waren. Es ist das Verdienst von NELSON, den rechtzeitigen Zeitpunkt für die Überimpfung bei Tierpassagen besonders herausgestellt zu haben. Nach der von ihm angegebenen Technik soll die Übertragung von einem syphilitischen Tier mit beginnender Orchitis auf ein gesundes Tier nicht nach dem 10. Tag post infectionem durchgeführt werden. Wir haben nach der Überimpfungsmethode, wie sie JAHNEL angegeben hatte, bei 26 Kaninchen in keinem Fall eine Orchitis zu einem früheren Zeitpunkt als 5—8 Wochen nach der Infektion gefunden. Dagegen war bei Tierpassagen, die wir nach der von NELSON beschriebenen Technik durchführten, der früheste Zeitpunkt einer beginnenden Orchitis der 5. Tag nach der Infektion. Meistens begann die Orchitis nach 8 bis 10 Tagen, in einigen Fällen beobachteten wir jedoch erst 14—20 Tage nach der Injektion virulenter *Treponemata pallida* in die Testes der Kaninchen eine beginnende Orchitis. Eine Erklärung für die auch nach der Technik von NELSON noch verhältnismäßig große Zeitdifferenz im Auftreten einer Orchitis glauben wir in der nicht konsequenten Einhaltung der Überimpfungstechnik und in dem verschiedenartigen Verhalten der einzelnen Versuchstiere finden zu können. In allen Fällen, in denen die Orchitis nach dem 10. Tag auftrat, waren wir von der ursprünglichen Überimpfungstechnik abgegangen. Aus Ersparnisgründen pipettierten wir zuerst die Treponemenaufschwemmung in die einzelnen Versuchsröhrchen zur Ausführung des Nelsontests und benutzten den verbleibenden Rest der Treponemenaufschwemmung für die Überimpfung. Die Gründe für das unterschiedliche Auftreten primärer syphilitischer Erscheinungen bei Tierpassagen liegen also letztlich nicht in Virulenzdifferenzen der Treponemen, sondern vor allem in verschiedenen Überimpfungsmethoden. Der frühe Zeitpunkt der Exstirpation der Testes verhindert die Überimpfung von Treponemen, die schon durch tiereigene Antikörper sensibilisiert sind.

Um den günstigsten Zeitpunkt für die Überimpfung zu finden, extirpierten wir 20 Tieren mit beginnender Orchitis nur einen Hoden. Nach einigen Tagen wurde der 2. Hoden herausgenommen. In 8 Fällen wurde der 1. Hoden nach 7 Tagen und der 2. nach 9 bzw. 10 Tagen extirpiert. Die Unterschiede in bezug auf den Treponemenreichtum in den einzelnen Testes waren trotz der Herausnahme an verschiedenen Tagen nur gering. Es fand sich jedoch in keinem Fall eine wesentliche Verminderung der Treponemenzahl in den zuletzt herausgenommenen Hoden. Bei den restlichen 12 Tieren, die wir für diesen Versuch benutzten, extirpierten wir den 1. Hoden nicht bei Beginn, sondern bei bereits stark entwickelter Orchitis. Der 2. Hoden wurde 1—2 Tage später herausgenommen und untersucht.

In allen Fällen war eine deutliche Verminderung der Treponemen im Gewebsbrei des zuletzt herausgenommenen Hodens festzustellen. Dieser Unterschied war so auffallend, daß eine plötzliche Abtötung der Treponemen in Betracht gezogen werden mußte. In 4 Fällen hatten wir bei Herausnahme des 1. Hodens je Blickfeld mehr als 50 Treponemen ausgezählt. Zwei Tage danach fanden wir in dem anderen Hoden desselben Tieres nur 1—2 Treponemen je Blickfeld. Eine Veränderung der Orchitis konnte weder klinisch noch nach Exstirpation histologisch festgestellt werden. Um nachzuweisen, ob in der Gewebsflüssigkeit des zuletzt her-



Abb. 1. Syphilome bei einem Kaninchen, 6 Wochen nach der Infektion mit *Treponemata pallida*

ausgenommenen Hodens treponemicid und treponemolytisch wirkende Antikörper vorhanden waren, wurde 0,1 cm<sup>3</sup> eines Preßsaftes aus dem zuletzt extirpierten Hoden gut beweglichen Treponemen im Basalmedium mit aktivem und inaktivem Komplement zugesetzt. Es zeigte sich, daß die Treponemen bei Anwesenheit von aktivem Komplement nach 18 Std immobilisiert waren. Auch bei der Kontrolle mit inaktivem Komplement lag der Prozentsatz der überlebenden Treponemen nur bei 78. Bei Überimpfung der Treponemen aus dem zuerst herausgenommenen Hoden dieses Tieres zeigte es sich, daß die Orchitis bei dem frisch inokulierten Tier trotz größerer Treponemenzahl später auftrat als bei Vergleichstieren. Die Vergleichstiere wurden mit einer Treponemenaufschwemmung, die 8—10 Treponemen je Blickfeld enthielt, infiziert. Die Treponemen waren aus den Hoden eines Versuchstieres mit beginnender Orchitis 8 Tage nach der Infektion entnommen.

Auf Grund dieser Versuche ist festzuhalten, daß die Treponemen auf der Höhe der Orchitis durch spezifische Antikörper schon sensibilisiert sein können und für Überimpfungsversuche nur bedingt geeignet sind.

Völlig ungeeignet für Tierpassagen ist die Benutzung eines Ausgangsmaterials aus Syphilomen, wie sie bei Kaninchen etwa 4—6 Wochen post infectionem auftreten (Abb. 1).

Die früheren Versuche, das infektiös wirkende Inkulum von *Treponemata pallida* zu bestimmen, waren deshalb ziemlich unvollkommen, weil der Zeitpunkt des Auftretens von Antikörpern beim Menschen und auch beim Tier nicht berücksichtigt wurde. Die ersten exakten quantitativen Messungen der infektiösen Dosis von *Treponemata pallida* wurden von THOMAS und MORGAN durchgeführt. Sie verwendeten eine Hodenemulsion in Kochsalzlösung und inokulierten 16 Kaninchen intratesticular mit je einem einzigen *Treponema pallidum*, 2 Kaninchen mit je 2 *Treponemata pallida* und ein Versuchstier mit 6 *Treponemen*. Bei keinem der Versuchstiere trat eine Syphilis auf. Die Autoren schlossen daraus, daß die infektiös wirkende Anzahl von *Treponemata pallida* höher liegen müsse als die von ihnen benutzte. Das Vorliegen einer symptomlosen Lues wurde durch Passageversuche ausgeschlossen. Nach Experimenten von VAN HAELEST und DE WILDE variierte die kleinste infektiös wirkende Dosis von Erregern aus frühzeitig entnommenen Lymphdrüsen zwischen 2 und 13 *Treponemen*. In deutlichem Gegensatz dazu betrug die kleinste infektiös wirkende *Treponemen*anzahl aus Hodensyphilomen zwischen 600 und 2500 *Treponemen*. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, daß um so mehr *Treponemen* nötig sind, eine Infektion einzuleiten, je älter die syphilitischen Läsionen sind, aus denen die Erreger gewonnen werden. Nach den Arbeiten von MAGNUSON, der die Anwesenheit von immobilisierenden Antikörpern im Gegensatz zu THOMAS und MORGAN berücksichtigte, wirken eine oder zwei *Treponemata pallida* bei Kaninchen, intratesticular inokuliert, regelmäßig infektiös.

Drei Faktoren sind für das Angehen der Infektion von ausschlaggebender Bedeutung:

1. Die Gewinnung der *Treponemen* zu einem Zeitpunkt, zu dem in vivo noch keine spezifischen Antikörper gebildet wurden.

2. Ein möglichst kurzer Zeitraum von der Entnahme der *Treponemen* aus infizierten Hoden bis zur Inokulation beim nächsten Tier.

3. Die Ausschaltung reiner physiologischer NaCl-Lösung als Verdünnungsflüssigkeit.

Die *Treponemen* verlieren in physiologischer NaCl-Lösung schneller ihre Beweglichkeit und Infektionstüchtigkeit als in einem Gemisch aus inaktiviertem Kaninchenserum und physiologischer NaCl-Lösung. Nach den Angaben von NELSON und unseren eigenen Erfahrungen genügen 20% inaktivierten Kaninchensersums in der Verdünnungsflüssigkeit, um gute Ergebnisse bei Tierpassagen zu gewährleisten.

#### *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest (T.P.I. Nelson-Test)

Da eine Züchtung virulenter *Treponemen* und damit die Gewinnung eines spezifischen Antigens in ausreichender Menge, mit dem eine Komplement-Bindungs- oder Flockungsreaktion durchgeführt werden könnte, bis heute noch nicht gelungen ist, kann der *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest als erste spezifische Antigen-Antikörperreaktion auf Lues trotz der komplizierten Technik nicht entbehrt werden.

1906 hat ERICH HOFFMANN als erster beobachtet, daß im Serum von Luikern ein Antikörper vorhanden sein muß, der *Treponemata pallida* nach einer gewissen Zeit immobilisiert. Er hat die Wichtigkeit

dieses Phänomens, das er im hängenden Tropfen beobachtet hatte, erkannt, und die wissenschaftliche Bedeutung dieser Beobachtungen hervorgehoben. SCHARNKE und RUETE stellten 15 Jahre später eine immobilisierende Wirkung von Serum und Liquor auf Gewebstreponemen fest. NOGUCHI und AKATSU wiesen auf die Wichtigkeit des Zusatzes von Komplement bei der Immobilisierung der *Treponemen* hin. EBERSON stellte ebenfalls bei Mischung syphilitischen Serum mit einer Aufschwemmung von *Treponemata pallida* fest, daß diese Seren durch eine treponemicid-wirkende Fähigkeit die Infektionstüchtigkeit der *Treponemen* aufhoben. TURNER führte Versuche durch, die in vivo die Anwesenheit von treponemicid-wirkenden Antikörpern beweisen sollten. Er injizierte Kaninchen an mehreren Stellen des Rückens intracutan virulente *Treponemata pallida* (NICHOLS), kombiniert mit Luikerserum bzw. Normalserum. Bei der Überimpfung von Luikerserum + *Treponemen*aufschwemmung aus Kaninchensyphilomen beobachtete TURNER ein verspätetes Auftreten und eine wesentlich geringere Ausdehnung der syphilitischen Hauterscheinungen. In einzelnen Fällen traten sogar keinerlei syphilitische Erscheinungen auf. Bei den Versuchstieren, bei denen er Normalserum + *Treponemen*aufschwemmung injiziert hatte, traten regelmäßig nach 4–6 Wochen typische Hautschanker auf. Man hatte jedoch lange Zeit die Beobachtung einer Immobilisierung der *Treponemen* durch im Serum vorhandene Antikörper nicht genügend beachtet.

Es ist das Verdienst von NELSON, der sich in den Jahren 1947 und 1948 intensiv mit der Frage der Züchtung virulenter *Treponemen* beschäftigte, diese Beobachtungen von HOFFMANN, SCHARNKE, RUETE, TURNER u. a. in experimentell bedeutungsvollen Versuchen ausgewertet zu haben. Besonders die Arbeiten von TURNER waren für NELSON ein wichtiger Hinweis und eine Basis für seine Experimente. Es gelang NELSON zwar nicht, ein Milieu zu finden, in dem sich das *Treponema pallidum* vermehrt hätte, seine genauen Beobachtungen über die Wirksamkeit einzelner Substanzen führten jedoch dazu, daß er in Zusammenarbeit mit dem Chemiker MAYER ein BasalmEDIUM entwickelte, in dem virulente *Treponemata pallida* bis zu 10 und 14 Tagen beweglich blieben. NELSON bestätigte die Feststellungen NOGUCHI u. a., daß absolut anaerobe Bedingungen notwendig sind, damit die *Treponemen* ihre Beweglichkeit und Infektionstüchtigkeit behalten. Diese anaeroben Bedingungen sind einerseits durch Evakuierung der entsprechenden Gefäße und andererseits durch reduzierende Substanzen, die in die Nährflüssigkeit gegeben werden, zu schaffen. Er stellte fest, daß der Ersatz des Sauerstoffs im BasalmEDIUM durch 95% Stickstoff und 5% CO<sub>2</sub> ein besonders langes Überleben der *Treponemen* gewährleistet. NELSON gab an, daß er ein Längenwachstum der *Treponemen* im BasalmEDIUM beobachtet hätte. Wir konnten diese Befunde bisher nicht bestätigen. Auch eine Vermehrung der *Treponemen* im BasalmEDIUM wurde weder von NELSON noch von einem der Nachuntersucher festgestellt. NELSON benutzte für alle Untersuchungen tier- und menschenpathogene *Treponemata pallida* (NICHOLS), die aus Kaninchenhoden gewonnenen wurden. Die Menschenpathogenität dieser *Treponemen* wurde durch mehrere unbeachtete Laborinfektionen bewiesen.

Die Technik des Nelson-Tests, wie sie sich uns auf Grund 3jähriger Erfahrungen entsprechend den in Deutschland gegebenen Möglichkeiten als besonders günstig herausstellte, haben wir an anderer Stelle ausführlich beschrieben. Es sollen hier nur kurz eine Zusammenfassung dieser Technik gegeben und dabei einige wichtige Punkte besprochen werden, die nach unseren Erfahrungen und Untersuchungen den Test erschweren und zu unkontrollierbaren, falschen Ergebnissen führen können.

**Technik.** Der Nachweis spezifischer, immobilisierender Antikörper wird in der Weise durchgeführt, daß aus Kaninchenhoden gewonnene, bewegliche Treponemata pallida (NICHOLS) in das Basalmedium verbracht werden. Alle Gewebsteile der Tests werden durch Zentrifugieren entfernt. Der Versuch wird in 2 Serien angesetzt, und zwar einer Hauptserie und einer Kontrollserie. Je 0,05 cm<sup>3</sup> des sterilen, inaktivierten Patientenserums werden in 2 Reagensgläser von 8 cm Länge und 1 cm lichter Weite einpipettiert. Zu der 1. Serie wird 0,1 cm<sup>3</sup> eines aktiven, zu der 2. Serie 0,1 cm<sup>3</sup> eines inaktiven Komplements gegeben. Die Röhrchen werden sofort verschlossen und in einen Anaerostaten bzw. Zeissler-Topf verbracht. Im Wechsel wird 3mal evakuiert und Stickstoff-CO<sub>2</sub> zugeleitet. Zuletzt bleibt das N<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>-Gemisch im Anaerostaten, der anschließend für 18 Std in einen Brutschrank von +35° C gegeben wird.

**Ablesen und Auswertung der Ergebnisse.** Die Reaktion wird nach 18 Std im Dunkelfeld bei einer Vergrößerung von 1:500 abgelesen. Es werden jeweils 25 oder 50 Treponemen ausgezählt. Das Kriterium der Immobilisierung ist für den positiven bzw. negativen Ausfall der Reaktion entscheidend. Bei Anwesenheit spezifischer Antikörper werden die Treponemen in der Hauptserie immobilisiert. In der Kontrollserie mit inaktivem Komplement bleiben alle Treponemen beweglich. Falls keine Antikörper im Serum vorhanden sind, bleiben die Treponemen in beiden Serien gut beweglich.

Bei Anwesenheit treponemicider Substanzen tritt auch in dem Röhrchen mit inaktivem Komplement eine Immobilisierung der Treponemen ein, die während der Ablesung der Kontrollen als solche erkannt wird. Die spezifische Immobilisierung wird in Prozent ausgedrückt. Die Differenz zwischen der Anzahl der beweglichen Treponemen mit aktivem und inaktivem Komplement wird mit  $\delta$  bezeichnet und, wie in der Tabelle 1 angeführt, ausgewertet.

Tabelle 1. Beurteilung der Ergebnisse im T.P.I.-Test

| Serum | Aktives Komplement, Beweglichkeit in % | Inaktives Komplement, Beweglichkeit in % | $\delta$ | Ergebnis       |
|-------|----------------------------------------|------------------------------------------|----------|----------------|
| 1     | 0                                      | 100                                      | 100      | positiv        |
| 2     | 100                                    | 100                                      | 0        | negativ        |
| 3     | 50                                     | 100                                      | 50       | zweifelhaft    |
| 4     | 0                                      | 0                                        | —        | unbefriedigend |

Ist  $\delta$  größer als 50, so erhält man ein positives Ergebnis. Ist  $\delta$  kleiner als 20, so handelt es sich um einen negativen Reaktionsausfall. Liegt  $\delta$  zwischen 20 und 50, muß das Resultat als zweifelhaft angesehen werden. Ein unbefriedigendes Ergebnis erhält man dann, wenn in beiden Röhrchen weniger als 70% beweglich sind.

Nach Beendigung des Tests wird eine Komplementkontrolle durchgeführt. Hämolytisches System, d. h. Hammelblutkörperchenaufschwemmung mit Amboceptor, wird in jedes Röhrchen einpipettiert. In der 1. Serie muß durch den Überschuß an Komplement das Hammelblut hämolysiert werden. In der 2. Serie mit inaktivem Komplement (Kontrollserie) darf keine Hämolyse eintreten. In jedem T.P.I.-Test werden Kontrollen eingeschaltet, die die einzelnen Faktoren prüfen.

**Fehlermöglichkeiten des Nelson-Tests.** Der Nelson-Test ist, wie jedes andere biologische Verfahren, mit technischen Fehlerquellen behaftet. Im folgenden sollen einige dieser Fehlermöglichkeiten näher angeführt werden, wie sie sich im Verlaufe unserer Arbeiten in den letzten 3 Jahren zeigten.

Wohl mit der wichtigste Punkt, von dem das Gelingen des Tests abhängig ist, ist die *rechtzeitige Auswahl des Kaninchens mit einer beginnenden Orchitis*. In einzelnen Fällen haben wir länger als 10 Tage bis zum Auftreten einer deutlichen Orchitis bei den Versuchstieren warten müssen. In der Mehrzahl der Versuche, die wir mit Kaninchenhoden, die erst nach 10—14 Tagen extirpiert wurden, durchführten, waren die Ergebnisse im Nelson-Test nicht eindeutig verwertbar. Es traten gehäuft zweifelhafte Reaktionen auf bzw. war der Prozentsatz der beweglichen Treponemen in den Kontrollen geringer als 80. In diesen Fällen haben wir den Nelson-Test wiederholt. Es ist nicht zu verantworten, daß die Ergebnisse eines solchen Tests verwertet und den Einsendern mitgeteilt werden. Man könnte einwenden, warum die Hoden nicht grundsätzlich vor dem 10. Tag nach der Infektion herausgenommen werden. Der Grund hierfür liegt darin, daß in einzelnen Fällen bei Herausnahme der Hoden vor dem 10. Tag nur 1—2 Treponemen je Blickfeld oder gar noch weniger zu finden waren. In diesem Fall ist das Ablesen des Tests äußerst mühsam. Wir konnten jedoch bei Herausnahme der Hoden bis zum 8. Tag nach der Inoculation in fast allen Fällen eine ausreichende Anzahl von Treponemen zur Durchführung des Tests gewinnen, auch wenn wir vorher keinerlei klinische Zeichen einer Orchitis bei den Kaninchen beobachtet hatten. Entscheidend für die Gewinnung einer ausreichenden Anzahl von Treponemen vor dem 10. Tag nach der Inoculation ist eine sorgfältige, optimale Überimpfungstechnik. In den Fällen, in denen eine Orchitis bei den Versuchstieren schon vor dem 8. Tag eintritt, darf mit der Herausnahme der Hoden nicht länger gewartet werden, da sonst in vivo immobilisierende Antikörper auftreten können. In 2 Fällen, in denen am 5. Tag eine Orchitis auftrat, und wir die Hoden erst am 8. Tag extrahierten, stellten wir eine unspezifische Immobilisierung, vor allem in der Hauptserie, fest. Hierin liegt naturgemäß eine große Gefahr. Es kann ohne weiteres passieren, daß die Kontrollserie verhältnismäßig einwandfrei arbeitet, d. h., daß faßt 80% der Treponemen bei Anwesenheit von inaktivem Komplement beweglich sind. In der Hauptserie mit aktivem Komplement sind dagegen nur 40 oder 50% der Treponemen beweglich. Es ist deshalb notwendig, in jeden Versuch negative Kontrollseren einzuschalten, wodurch man ohne weiteres diese Fehlerquellen aufdecken kann.

Eine 2. Fehlerquelle kann eine *zu geringe Anzahl von Treponemen im Basalmedium* sein. Auch in diesen Fällen, in denen die Ablesung außerordentlich erschwert ist, und zu der oft mehr als 10 Std benötigt werden, kann eine unspezifische Immobilisierung der Treponemen eintreten. Durch das wiederholte Öffnen des Anaerostaten und die langen Ablesungszeiten ist eine spontane Immobilisierung durch Anwesenheit von Sauerstoff möglich.

Als 3. Fehlerquelle eruierten wir, daß die verschiedenen Substanzen, die für das Basalmedium benötigt werden, oft in den einzelnen *Chargen Unterschiede* zeigten. So fanden wir z. B., daß der Test mit Natriumthioglykolat, das keinen so weitgehenden Reinigungsgrad aufwies wie die früher benutzten Proben nicht einwandfrei durchzuführen war.

Weiterhin stellten wir fest, daß das Aqua dest., das uns von einer Apotheke geliefert wurde, zeitweilig

nicht einwandfrei war und eine spontane Immobilisierung der Treponemen bewirkte. Diese Beobachtung, die wir erst nach zahlreichen Versuchen machen konnten, führte uns dazu, statt des Aqua dest. oder Aqua bidest. im Nelson-Test Quellwasser zu benutzen. Wir erhielten dieses Quellwasser aus einem Tiefbrunnen und erhielten bei der Verwendung dieses Wassers einwandfreie Ergebnisse.

Als weitere Fehlermöglichkeit bei der Durchführung des Nelson-Tests stellten wir fest, daß Rinderseum, das durch ein versilbertes Ultrafilter gepreßt wurde, eine Immobilisierung der Treponemen bewirkte. Es dürfen für diesen Zweck, wie wir auf Grund unserer Versuche herausfanden, nur Glas- oder V2A-Filter verwendet werden.

Eine weitere Möglichkeit, die zu einer unspezifischen Immobilisierung der Treponemen führen kann, ist die *unvollständige Entfernung von Desinfizientien*, die beim Desinfizieren der Glasgeräte und sonstigen Instrumente benutzt werden. Es muß strengstens darauf geachtet werden, daß alle benötigten Glaswaren und sonstigen Geräte nach der Desinfektion unter fließendem Wasser gereinigt und anschließend in Aqua dest. nachgespült werden.

Da das *Treponema pallidum* ein strikter Anaerobier ist, können *Änderungen des sauerstofffreien Milieus* während der Durchführung des Tests zu einer unspezifischen Immobilisierung führen. Um festzustellen, ob die reduzierenden Substanzen im Basalmilieu ausreichend und die anaeroben Bedingungen, unter denen der Nelson-Test durchgeführt werden muß, voll gewährleistet sind, haben wir eine zusätzliche Kontrolle eingeschaltet. Wir gaben in ein Kontrollröhrchen, das mit 2 cm<sup>3</sup> der Treponemenaufschwemmung beschickt wurde, 0,03 cm<sup>3</sup> einer 0,02%igen wäßrigen Methylenblaulösung. Durch ausreichend reduzierende Substanzen im Basalmilieu wird das Methylenblau im N<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>-Milieu in die reduzierte farblose Form, das Leukomethylenblau, übergeführt. Bei Herausnahme des Kontrollröhrchens aus dem Anaerostaten nach 18 Std muß die Treponemenaufschwemmung + Methylenblau völlig farblos sein.

Eine weitere Fehlermöglichkeit ist durch die Verwendung eines Stickstoff+CO<sub>2</sub>-Gemisches gegeben, dessen Sauerstoffgehalt zu hoch ist. Der Sauerstoffgehalt eines brauchbaren N<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>-Gemisches muß unter 0,1% liegen. Mit Pyrogallol ist in folgender Weise eine Kontrolle des Gasgemisches möglich:

20 cm<sup>3</sup> Aqua dest. werden mit Natriumhydroxyd alkalisiert. Das zu prüfende N<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>-Gemisch wird in diese Lösung eingeleitet und somit der Sauerstoff in der Flüssigkeit durch N<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> verdrängt. Unter fortdauerndem Einleiten des Gasgemisches wird eine Spatelspitze Pyrogallol in die Flüssigkeit gegeben. Etwa 10 min wird das zu prüfende Gasgemisch weiter in die Lösung eingeleitet. Während dieser Zeit muß die Lösung völlig farblos bleiben. Wenn bei dieser Kontrolle ein brauner Farbumschlag eintritt, ist das Gasgemisch für den *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest ungeeignet.

Von der Verwendung von aktivem oder inaktivem Rinderseum statt Rinderseum-Ultrafiltrat ist abzuraten. Wir stellten bei wiederholten Versuchen fest, daß bei Benutzung von Rinderseum im Nelson-Test ein Schwund der Treponemen in allen positiven Seren eintrat. McLEOD u. a. beobachteten eine ähnliche Wirkung bei Versuchen mit dem *Treponema pallidum*-Immun-Adhärenztest (T.P.I.A.-Test).

Eine weitere Fehlerquelle, die wir bei unseren Versuchen bisher nicht beobachteten, besteht in einer In-

jektion der Versuchstiere mit *Treponema cuniculi*. Aus dem John-Hopkins-Hospital wurde berichtet, daß vom 1. 12. 52 bis 30. 11. 53 1025 Seren im Nelson-Test untersucht wurden. 50% aller Versuche waren aus verschiedenen Gründen unbefriedigend. Die hohe Zahl der nicht verwertbaren Untersuchungen im Nelson-Test erklärte sich nach den Angaben von NELL vor allem aus 2 Gründen.

1. Es wurde erst nach langwierigen Versuchen festgestellt, daß bei den Versuchskaninchen Infektionen mit *Treponema cuniculi* aufgetreten waren, und zwar schon vor der Beimpfung mit *Treponemata pallida*. Wir haben an anderer Stelle schon darauf hingewiesen, daß eine Infektion mit *Treponema cuniculi* zur Bildung von Antikörpern führt, die auch das *Treponema pallidum* immobilisieren. Eine Immobilisierung der *Treponemata pallida* tritt bei einer Infektion mit *Treponema cuniculi* schon in vivo ein bzw. sensibilisierte *Treponemata pallida* werden nach Zugabe von frischem Komplement in vitro immobilisiert. Nach Angaben von NELL wurde diese Infektion der Tiere erst nach mehreren Wochen festgestellt.

Es zeigte sich, daß neu gekaufte Tiere die Kaninchenspirochätose eingeschleppt hatten.

Wir haben seit jeher beim Ankauf neuer Tiere das Serum sofort im *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest untersucht, um die Verseuchung unseres Tierbestandes mit *Treponema cuniculi* zu verhindern. Eine alleinige Untersuchung der Tierseren in den Lipoid-Bindungsreaktionen ist nicht ausreichend, da diese Reaktionen trotz Infektion der Tiere mit *Treponema cuniculi* negativ sein können. Auf der anderen Seite fanden wir auch bei gesunden Kaninchen häufig einen positiven Ausfall in den Lipoid-Bindungsreaktionen.

2. Bei weiteren Versuchsserien im Nelson-Test stellte NELL fest, daß nur eine geringe Anzahl von Treponemen im Basalmilieu zu finden waren, und daß diese nach 18 Std in der Kontrolle ohne Serum und Komplement keine Beweglichkeit mehr zeigten. Erst nach längerer Zeit fand man heraus, daß mit *Aureomycin präpariertes Tierfutter* für die Ernährung der Kaninchen verwendet wurde. Es handelte sich demnach bei der Immobilisierung der Treponemen um einen antibiotischen Effekt. Gerade in Amerika ist eine derartige Präparierung des Futters weit verbreitet. Es ist daran zu denken, daß auch in Deutschland eines Tages ähnliche Faktoren bei der Durchführung des Nelson-Tests berücksichtigt werden müssen.

Es wurde eingangs darauf hingewiesen, daß das frühzeitige Auftreten einer Orchitis und der rechtzeitige Termin für die Herausnahme der Hoden bei der Durchführung des Nelson-Tests von wesentlicher Bedeutung sind. TURNER berichtete über eingehende Versuche, die sich mit dem Einfluß der Temperatur in den Tierstallungen auf das Auftreten primärer syphilitischer Erscheinungen bei Kaninchen beschäftigen.

Nach seinen Angaben verzögern warme Temperaturen, d. h. Temperaturen zwischen 27 und 35°C das Auftreten einer Orchitis bei Tieren, die mit *Treponema pallidum* intratesticular infiziert waren. Er führte Kontrollversuche durch, die zeigten, daß bei Kaninchen, die in Räumen gehalten wurden, die zwischen 18 und 21°C temperiert waren, nach intracutaner Impfung mit etwa 500 *Treponemata pallida* je Kubikzentimeter dem 15. und 20. Tag syphilitische Hauterscheinungen auftraten. Bei Kaninchen, die in gleicher Weise mit derselben Anzahl Treponemen infiziert wurden,

jedoch bei einer Raumtemperatur zwischen 27 und 35° C gehalten wurden, traten spezifische Hautveränderungen in großer Schwankungsbreite erst zwischen dem 21. und 71. Tag auf. Hohe Temperaturen in überheizten Stallungen und während des Sommers müssen auch in Deutschland berücksichtigt werden.

Auf Grund der äußerst komplizierten Technik und der zahlreichen Fehlermöglichkeiten kann eine routinemäßige Durchführung des *Treponema pallidum*-Immobilisierungstests nur besonders ausgebildeten Ärzten und geschultem Hilfspersonal übertragen werden.

#### *Vereinfachungen des Treponema pallidum-Immobilisierungstests*

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die Technik des Nelson-Tests zu vereinfachen. Wir selbst haben eine Methodik ausgearbeitet, die eine exakte Durchführung dieses Tests auch ohne den größten Teil der von NELSON angegebenen Apparate ermöglicht und sich nach den in Deutschland gegebenen Möglichkeiten richtet. Wir haben hierüber ausführlich an anderer Stelle berichtet.

#### *Durchführung des Nelson-Tests mit eingefrorenen Treponemen*

Die Untersucher sind bei der Durchführung des Nelson-Tests darauf angewiesen, auf das Auftreten einer syphilitischen Orchitis bei den experimentell infizierten Kaninchen zu warten. Der Zeitpunkt der ersten Erscheinungen der Orchitis fällt zum Teil gerade auf den Sonnabend oder Sonntag. An diesen Tagen ist die routinemäßige Durchführung des Nelson-Tests meist nicht möglich. CHORPENING stellte Versuche an, eingefrorene statt frischer Kaninchentests als Ausgangsmaterial für den Nelson-Test zu benutzen. Er stützte sich bei diesen Versuchen auf Ergebnisse von TURNER, der nachgewiesen hatte, daß *Treponemata pallida* in Kaninchenhoden bei —76° C eingefroren und aufbewahrt, noch nach Monaten und sogar noch nach mehreren Jahren infektionstüchtig sind. Der Sinn dieser Versuche CHORPENINGS war der, eine zeitliche Unabhängigkeit hinsichtlich eines Auftretens der Orchitis und Durchführung des Nelson-Tests zu erreichen.

Eine größere Anzahl Kaninchen wurde intratesticular mit *Treponemata pallida* infiziert. Je nach Auftreten der Orchitis wurden die Hoden herausgenommen, aufgeschnitten, in physiologischer NaCl-Lösung kurz gewaschen und anschließend bei —78° C eingefroren. Diese Tests wurden dann bei —45 bis —55° C über Wochen aufbewahrt und je nach Bedarf für die Durchführung des Nelson-Tests benutzt. Vor der Durchführung des Tests wurden die eingefrorenen Kaninchenhoden 5–10 min in ein Wasserbad von +35° C gegeben. Nach dem Auftauen wurden die Tests in das Basalmedium verbracht und anschließend der Nelson-Test durchgeführt.

CHORPENING, ANDERSON, KENT u. a. konnten feststellen, daß die Beweglichkeit der *Treponemata pallida* im T.P.I.-Test bei der Benutzung gefrorener Hoden nur um einen kleinen Prozentsatz geringer war als bei der Benutzung frischer Kaninchenhoden. Die Zeitdauer, während der die Kaninchenhoden aufbewahrt wurden, schwankte zwischen einem Tag und 1/2 Jahr. Nach den Erfahrungen der angeführten Autoren hat die Zeitdauer der Aufbewahrung keinen Einfluß auf die Prozentzahl der beweglichen Treponemen nach dem Auftauen. Bei allen Versuchen zeigte es sich, daß bei Benutzung gefrorener Hoden um 8–10% weniger Treponemen nach dem Auftauen beweglich

waren als bei der Benutzung frischer Hoden. Da uns Tiefkühltruhen von —50 bis —78° C nicht zur Verfügung standen, führten wir unsere Versuche bei —20° C durch. Die Beweglichkeit nach dem Auftauen lag unter 50%, so daß ein T.P.I.-Test mit den bei —20° C eingefrorenen Treponemen nicht durchführbar war.

#### *Änderungen des Nährmilieus (Basalmedium)*

Bis auf Änderungen der Zusammensetzung des Basalmediums, die von zahlreichen Autoren beschrieben wurden, hat es außer DELACRETAZ bisher niemand unternommen, ein grundsätzlich anderes Milieu für die Lebenderhaltung der Treponemen auszuarbeiten. DELACRETAZ benutzte statt des von NELSON angegebenen Basalmediums einen Extrakt aus Mäuseembryonen. Er gibt an, daß er mit diesem Extrakt bei der Durchführung des T.P.I.-Tests gleich gute Ergebnisse erzielt hätte wie mit dem Basalmedium von NELSON und MAYER. THIVOLLET führte Nachuntersuchungen durch und kam zu ähnlich guten Ergebnissen in bezug auf das Überleben der Treponemen wie DELACRETAZ. Er stellte jedoch fest, daß der Prozentsatz der überlebenden Treponemen im Embryonalextrakt durchschnittlich etwas geringer war als in dem Basalmedium von NELSON und MAYER. Die Benutzung eines Mäuse-Embryonalextraktes statt des Basalmediums führt unseres Erachtens zu keiner Vereinfachung bei der Durchführung des Nelsontests.

#### *Treponema pallidum-Immun-Adhärenztest (T.P.I.A.-Test)*

1950 begann NELSON mit Versuchen, die das Ziel hatten, eine in vitro-Phagocytose der *Treponemata pallida* zu demonstrieren. Er führte die ersten Versuche nach den Methoden von MAALE durch.

Es wurden gewebefreie Suspensionen von lebenden oder bei Hitze abgetöteten Treponemen mit syphilitischem Serum gemischt. Dieser Mischung wurde dann frisch gewonnenes, heparinisiertes Gesamtblut eines gesunden Individuums zugesetzt. Nach Aufenthalt im Brutschrank bei +37° C stellte NELSON ein auffallendes Verschwinden der Treponemen fest. Mischte er jedoch eine Treponemensuspension mit nicht-syphilitischem Serum und fügte anschließend Blut hinzu, so trat dieser Schwund nicht ein. NELSON nahm auf Grund dieser Untersuchungen an, daß ein spezifischer Antikörper für das Schwundphänomen verantwortlich sein müsse. Mit Hilfe von Absorptionsverfahren gelang ihm der Beweis, daß die bei diesem Vorgang wirksamen spezifischen Antikörper nicht mit Lipoidreaktionen identisch sind. NELSON konnte außerdem nachweisen, daß für den Schwund der Treponemen in erster Linie Erythrocyten und nicht Leukocyten verantwortlich sind. Auf Grund weiterer Untersuchungen gelang es ihm, eine Reaktion auszuarbeiten, die zum Nachweis spezifischer Antikörper führte, die für dieses Adhärenzphänomen an Erythrocyten verantwortlich waren.

Der wesentliche Vorteil dieser Reaktion gegenüber dem *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest liegt darin, daß für die Versuche auch bei Hitze abgetötete Treponemen verwendet werden können. Es fällt somit die Infektionsgefahr für die Untersucher fort, die bei der Durchführung des Nelson-Tests besonders berücksichtigt werden mußte. Eine endgültige Trennung dieser Antikörper von den *Treponema pallidum*-immobilisierenden Antikörpern gelang bisher nicht. Es stellte sich bei den Versuchen von NELSON heraus, daß die Immun-Adhärenzreaktion sehr sensibel war und schon geringe Antikörpermengen zu einem positiven Ergebnis führten. Es war also notwendig, daß die Treponemensuspension keine in vivo gebildeten

Antikörper enthält. Der Zeitpunkt der Hodenexstirpation bei infizierten Kaninchen ist auch für diesen Test von ausschlaggebender Bedeutung. Es mußte versucht werden, die Antikörperbildung in vivo zu verhindern oder zumindest zu verzögern. SELDEEN und MAYER entwickelten eine Methode, die zu einer Verzögerung der Antikörperbildung bei infizierten Kaninchen führte. Es gelang mit Hilfe einer Röntgenbestrahlung vor der Infektion, diese Verzögerung zu erreichen. Die Röntgendosis beträgt 600 r bei Tiefentherapiebedingungen. Auch das Auftreten der Orchitis wird durch die Röntgenvorbestrahlung meist verzögert. Die Hoden müssen deshalb zu einem Zeitpunkt herausgenommen werden, zu dem eine klinisch feststellbare Orchitis noch nicht eingetreten ist. Die Technik dieser zweiten spezifischen Antigen-Antikörperreaktion auf Lues ist — kurz zusammengefaßt — folgende:

**Technik. Antigenbereitung.** Alle Versuche werden mit virulenten *Treponemata pallida* (NICHOLS) durchgeführt. Die Kaninchen werden 1 Tag vor der Inoculation mit 600 r bestrahlt. Acht Tage nach der intratesticulären Injektion mit *Treponemata pallida* werden die Tests extirpiert. Die Treponemen werden in einer isotonischen Lösung, die 0,5% Rinderalbumin sowie Phosphatpuffer pH 7,1 und Kochsalz enthält, suspendiert. Nach den Erfahrungen von DAGUET eignet sich auch das Basalmedium von NELSON und MAYER zur Durchführung des Tests. Die aufgeschnittenen Kaninchentests und die wäßrige Lösung werden in einen Duranglaskolben gegeben und 2–3 Std bei +35° C langsam im Wasserbad geschüttelt. Nach dieser Zeit wird die Treponemensuspension abgegossen und 10 min bei 2000 Touren zentrifugiert. Die Treponemen in der gewebsfreien Suspension werden 30 min bei +56° C gehalten und hierdurch abgetötet. Je Blickfeld sollen in dieser Suspension bei einer Vergrößerung von 1:590 10–15 Mikroorganismen sichtbar sein. Die Antigenlösung wird in sterilen Gefäßen bei +5° C aufbewahrt. Sie ist mehrere Wochen haltbar.

**Serum.** Der bei diesem Test reagierende Antikörper ist thermostabil. Alle Seren werden vor dem Versuch 1 Std bei +56° C inaktiviert.

**Komplement.** NELSON stellte fest, daß diese Reaktion nur bei Anwesenheit von aktivem Komplement eintritt. Als Komplement kann benutzt werden: 1. Serum gesunder Meerschweinchen, 2. Menschenserum, 3. Serum der Versuchsperson. In diesem 3. Fall entfällt das Erhitzen auf +56° C.

**Direkte Reaktion.** Es wird das Antigen und defibriertes Gesamtblut eines Patienten benutzt. Diese Methode ist verhältnismäßig einfach. Es müssen jedoch mehrere Kontrollen eingeschaltet werden, da der Titer des Komplements unbekannt ist.

**Indirekte Reaktionen.** Antigen + Patientenserum + defibriertes Gesamtblut eines gesunden Spenders.

Antigen + Patientenserum + Meerschweinchenkomplement + menschliche Erythrocyten + Meerschweinchenleukozyten. Es muß darauf geachtet werden, daß das Serum bzw. Blut von nüchternen Patienten entnommen wird, da die Ablesung bei chylösem Serum im Dunkelfeld erschwert ist.

Zu 0,6 cm<sup>3</sup> Antigen wird 0,1 cm<sup>3</sup> inaktiviertes Serum hinzugefügt. Dies Gemisch wird für 1 Std in ein Wasserbad von +37° C gegeben. Anschließend werden in jedes Röhrchen 0,3 cm<sup>3</sup> defibriertes Blut bzw. Blutkörperchen + Komplement einpipettiert. Die Röhrchen werden für weitere 30 min in ein Wasserbad von +37° C gegeben. Nach dieser Zeit werden sie 5 min bei 500 Umdrehungen zentrifugiert, um die Erythrocyten und die daran haftenden Treponemen zu entfernen. Diese Geschwindigkeit reicht nicht aus, um frei in der Lösung vorhandene Treponemen zu sedimentieren. Die überstehende klare Flüssigkeit wird abgegossen. 0,005 cm<sup>3</sup> der Suspension werden auf einen Objektträger gegeben und mit einem 22 × 22 mm-Deckglas bedeckt.

**Ablesung und Auswertung der Ergebnisse.** Der Versuch wird im Dunkelfeld bei einer Vergrößerung von 1:590 abgelesen. 20 Blickfelder werden ausgezählt und die Zahl der Treponemen notiert. Mehrere Kontrollen müssen eingeschaltet werden: 1. Physiologische NaCl-Lösung + Antigen; 2. Rinderserum-Ultrafiltrat + Antigen + Blut; 3. bekanntes positives Serum + Antigen + Blut; 4. bekanntes negatives Serum + Antigen + Blut.

Der Test wird als positiv angesehen, wenn der Prozentsatz des Treponemenschwundes in den Versuchsröhrchen im Vergleich zu den Kontrollen 1 und 2 50% oder mehr beträgt. Das Resultat ist negativ, wenn der Treponemenschwund geringer als 50% ist.

Der *Treponema pallidum*-Immun-Adhärenztest zeigt in seinen Resultaten weitgehende Übereinstimmung mit dem *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest. Auf die technischen Schwierigkeiten und Fehlerquellen der Reaktion soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.

#### *Agglutinationsreaktion mit Treponemata pallida* (Nichols)

Es sind viele erfolglose Versuche unternommen worden, eine Agglutinationsreaktion mit *Treponemata pallida* zu entwickeln. Die Bemühungen scheiterten meist an der häufig auftretenden Spontanagglutination der Treponemen. CAIN, der Kaninchen vor und nach der Infektion röntgenbestrahlte, um hierdurch eine Antikörperbildung zu unterdrücken, berichtete über eine spezifische Agglutination mit *Treponemata pallida*. TANI wies darauf hin, daß mit Antiformin abgetötete Treponemen nicht zur Spontanagglutination neigen. Bei Nachprüfungen konnten HARDY und HOLLANDER diese Ergebnisse nicht bestätigen. Sie beschrieben eine besondere Methode der Antigengewinnung.

Gesunden, ausgewachsenen Kaninchen injizierten sie je 0,5 cm<sup>3</sup> Treponemenaufschwemmung je Hoden. Am 3. oder 4. Tag nach der Inoculation gaben sie den Tieren täglich 6 mg Cortison je Kilogramm Körpergewicht intramuskulär. Diese Injektionen wiederholten sie täglich bis zur Tötung der Kaninchen. Sie entbluteten die Tiere gewöhnlich zwischen dem 12. und 16. Tag nach der Inoculation. Die Hoden wurden aufgeschnitten, in 15 cm<sup>3</sup> 0,85%iger NaCl-Lösung aufgenommen und anschließend 3 Std bei +4° C geschüttelt. Nach der Extraktion der Treponemen zentrifugierten sie die Suspension 5 min bei 1000 Umdrehungen, um Gewebsteile zu entfernen. Die überstehende Flüssigkeit zentrifugierten sie 1 Std lang bei 3500 Umdrehungen, um die Treponemen zu sedimentieren.

Das Sediment wurde in 0,85%iger NaCl-Lösung aufgenommen und enthielt im Durchschnitt etwa 100 Mill. Treponemen je Kubikzentimeter. Sie töteten die Treponemen durch 2 Std langes Erhitzen bei +65° C ab. Zur Konservierung des Antigens wurde Merthiolate bis zur Endkonzentration von 0,01% hinzugegeben und die Suspension im Eisschrank aufgehoben. Den Agglutinationstest führten sie dann routinemäßig mit einer Serumverdünnung von 1:20 durch. 0,1 cm<sup>3</sup> der Serumverdünnung wurde mit 0,1 cm<sup>3</sup> der Treponemenaufschwemmung gemischt und 1 Std geschüttelt. Sie gaben den Versuch über Nacht in ein Wasserbad von +45° C und lasen am nächsten Tag im Dunkelfeld ab.

Bei der Untersuchung von Kaninchenseren ergab diese Methode brauchbare Resultate. Bei der Untersuchung von menschlichem Serum traten jedoch zahlreiche unspezifische Agglutinationen auf.

HARDY und HOLLANDER stellten fest, daß diese Agglutinationen durch unspezifische Antikörper bedingt waren. Bei weiteren Versuchen fanden sie, daß Hühner, die mit Kaninchenerythrocyten immunisiert wurden, Treponemenagglutinine bildeten. Diese Beobachtung führte die Autoren zu der Versuchsanordnung, vor dem Test eine Absorption menschlicher Seren mit Kaninchenerythrocyten durchzuführen. Nach der Absorption traten nur noch in ganz vereinzelten Fällen unspezifische Agglutinationen auf. Bei späteren Versuchen zeigte es sich, daß auch normales Kaninchen Serum genügte, um eine unspezifische Agglutination bei Menschenserum zu verhindern. SOHIER und THIVOLLET fanden in Übereinstimmung mit

TANI, CAIN, HARDY und HOLLANDER, daß die Herstellung eines Antigens für die Agglutinationsreaktion äußerst schwierig ist. Sie stellten im Gegensatz zu den anderen Autoren fest, daß bei einzelnen Tieren, unabhängig von der Vorbehandlung mit Röntgenstrahlen oder Cortison, frühzeitig eine Orchitis auftrat, und daß in diesen Fällen ein gutes Ergebnis ohne Spontanagglutination zu erhalten war, daß aber — im Großen gesehen — nur wenige Antigene brauchbar waren.

McLEOD und STOKES stellten ebenfalls ein Antigen für die Agglutinationsreaktion mit *Treponemata pallida* her.

7—10 Tage nach der Inoculation exstirpierten sie die Tests der Kaninchen. Eine Vorbehandlung mit Röntgenstrahlen oder Cortison führten sie nicht durch. Sie vermieden es jedoch, die Hoden zu einem Zeitpunkt zu exstirpieren, zu dem schon eine deutliche Orchitis festzustellen war. Nur wenige Treponemensuspensionen zeigten nach ihren Angaben eine Spontanagglutination. McLEOD benutzte zur Aufnahme der Treponemen eine physiologische NaCl-Lösung und erwärmte die Aufschwemmung für 40 min auf  $+56^{\circ}\text{C}$ . Zu dem Antigen wurden 5% Rinderalbumin gegeben. Die Treponemensuspension wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufgehoben.

Da McLEOD und STOKES beobachteten, daß trotz der Verdünnung des Rinderserums in einzelnen Fällen auch unspezifische Agglutinationen auftraten, versuchten sie, die Antikörper zu differenzieren, die für die spezifische und die unspezifische Agglutination verantwortlich waren. Sie stellten fest, daß eine viermalige Absorption mit VDRL-Antigen (Cardiolipin) notwendig war, um unspezifische Agglutinationen durch Lipoidreagine zu verhindern. Die Ergebnisse, die sie nach Absorption der Seren mit Cardiolipinantigen erhielten, bewiesen, daß im Serum außer den zu einer unspezifischen Agglutination führenden Lipoidreaginen noch andere agglutinierende Antikörper vorhanden sein mußten. Weiterhin stellten sie fest, daß ein Erhitzen des Antigens auf  $100^{\circ}\text{C}$  zwar die Sensibilität erhöhte, daß jedoch gleichzeitig vermehrt unspezifische Reaktionen auftraten. Diese Versuche zeigen, wie schwierig es ist, spezifische Agglutinationsreaktionen mit *Treponemata pallida* durchzuführen. Der *Treponema pallidum*-Agglutinations-test besitzt zwar eine besonders große Sensibilität, es muß jedoch bei der Agglutinationsreaktion mit unspezifischen Reaktionen gerechnet werden.

**Zusammenfassung.** Die routinemäßig durchführbaren Antigen-Antikörperreaktionen mit apathogenen Kulturspirochaetales (Kulturtreponemen) werden näher beschrieben. Es wird darauf hingewiesen, daß drei verschiedene Antikörper- und Reagengruppen bei der serologischen Diagnostik der Lues unterschieden werden müssen. Die von PUCCINELLI vorgeschlagene Differenzierung in „diagnostische Antikörper“ bzw. „diagnostische Reagine“ und „immunologische Antikörper“ wird befürwortet, jedoch darauf hingewiesen, daß die in der sog. „Pallida“-Reaktion (GAEHTGENS) nachweisbaren Antikörper nicht in die Gruppe der spezifischen, sondern in die der charakteristischen, diagnostischen Antikörper bei Lues einzuordnen sind. Nach einer kurzen Besprechung der Technik und des Wesens der Agglutinations- und der Komplement-Bindungsreaktion mit Kulturspirochaetales (REITER)

werden die verschiedenen Antigen-Antikörperreaktionen mit *Treponemata pallida* ausführlich behandelt. Die auf Grund eigener 3jähriger Versuche mit dem Nelson-Test gesammelten Erfahrungen werden mitgeteilt und einige wichtige Punkte herausgestellt, die die Untersuchungen im Nelson-Test erschweren und zu unkontrollierbaren, falschen Ergebnissen führen können. Es wird auf die Möglichkeit einer Durchführung des Nelson-Tests mit virulenten Treponemen, die nach Angaben CHORPENINGS bei  $-78^{\circ}\text{C}$  eingefroren und über Monate aufbewahrt wurden, hingewiesen. Eigene Versuche, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  konservierte Treponemen im Nelson-Test zu benutzen, zeigten keine befriedigenden Resultate.

Der *Treponema pallidum*-Immun-Adhärenz-Test (NELSON) und die Agglutinationsreaktion (McLEOD, STOKES, HARDY und HOLLANDER) erlauben es erstmalig, spezifische Antigen-Antikörperreaktionen auf Lues mit abgetöteten *Treponemata pallida* durchzuführen. Die Technik und Grundzüge dieser Reaktionen werden entsprechend dem Stand der heutigen Forschung erörtert, und auf die besondere Schwierigkeit der Antigengewinnung hingewiesen. Der *Treponema pallidum*-Immun-Adhärenz-Test und der *Treponema pallidum*-Immobilisierungs-Test zeigen in ihren Ergebnissen eine weitgehende Übereinstimmung. Die Agglutinationsreaktion mit abgetöteten *Treponemata pallida* ist zwar technisch einfach auszuführen, jedoch verhindern unspezifische Agglutinine vorerst noch eine routinemäßige Durchführung dieser Reaktion auf breiter Basis.

**Literatur.** ANDERSON, R., J. KENT and R. W. SANDERS: Amer. J. Syph. **38**, 527 (1954). — BERGEY, D. H.: J. Bacter. **3**, 542 (1918). — CAIN, L.: WHO Newsletter, MH/CT/47 1954. CHORPENING, F. W., R. W. SANDERS and J. KENT: Amer. J. Syph. **36**, 401 (1952). — DAGUET: WHO Newsletter, MH/CT/88 1954. — D'ALLESSANDRO, G., e V. A. PUCCINELLI: Giorn. med. Italia **1**, 68 (1944). — DELACRETAZ, J.: Dermatologia (Basel) **106**, 264 (1953). — EBERSON, F.: Arch. of Dermat. **3**, 775 (1921). — FÜHNER, F.: Ref. Hamburger Ärztebl. **1952**, 216. — Ärztl. Wschr. **1952**, 644. — GAEHTGENS, W.: Med. Klin. **1929**, 390. — Arch. of Dermat. **42**, 176 (1937). — HAELEST, VAN, and DE WILDE: Zit. in der Arbeit H. J. MAGNUSON, H. EAGLE, R. FLEISCHMANN, Amer. J. Syph. **32**, 1 (1948). — HARDY, K., and S. HOLLANDER: WHO Newsletter **1953**. — HENRICI, A. T.: The Biol. of Bacteria. 1948. — HOFFMANN, E.: Dtsch. med. Wschr. **1905**, 43. — JAHNEL, F.: Klin. Wschr. **1934**, 550. — MAALE, O.: On the relation between alexin and complement. Copenhagen 1946. — McLEOD, C. H., and H. J. MAGNUSON: J. Ven. Dis. Inform. **32**, 9 (1953). — Amer. J. Syph. **37**, 9 (1953). — MEINICKE, K.: Hautarzt **4**, 268 (1953). — NELL, E.: Amer. J. Syph. **38**, 92 (1954). — NELSON, R.: Amer. J. Hyg. **1948**, 120. — Hautarzt **3**, 436 (1952). — NELSON, R., and M. MAYER: J. of Exper. Med. **89**, 369 (1949). — NICHOLS, H. J.: J. of Exper. Med. **19**, 362 (1914). — Amer. J. Trop. Med. **5** (1914). — NOGUCHI, H., and S. AKATSU: J. of Exper. Med. **25**, 765 (1917). — ROEMER, G.: Klin. Wschr. **1948**, 574. — ROEMER, G., u. H. W. SCHLIPKÖTER: Dtsch. med. Wschr. **1953**, 345. — Z. Hyg. **140**, 528 (1954). — SCHARNKE, H., u. W. RUETE: Z. Neur. **64**, 343 (1921). — SELDEEN, M., u. M. MAYER: WHO Newsletter, MH/CT/47 1954. — SOHIER and THIVOLLET: WHO Newsletter, MH/CT/73 1953. — TANI, T.: Jap. J. of Exper. Med. **18**, 11 (1940). — THOMAS, J., and M. MORGAN: Zit. in der Arbeit H. J. MAGNUSON, H. EAGLE, R. FLEISCHMANN, Amer. J. Syph. **32**, 1 (1948). — TURNER, T. B.: J. of Exper. Med. **69**, 867 (1939).

**Anschrift:** Priv.-Doz. Dr. K. MEINICKE, München 15, Frauenlobstr. 9, Dermatologische Universitätsklinik



*Sonderabdruck*  
*aus „Der Hautarzt“, 7. Jahrgang, 12. Heft, Dezember 1956, S. 540—543*

---

*Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg*

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. A. MARCHIONINI)

## Eine Komplement-Titer- und Komplement-Bindungsreaktion mit *Treponemata pallida*\*

VON KURT MEINICKE

In den letzten Jahren wurden in Amerika Versuche durchgeführt, neben dem T.P.I.-Test weitere spezifische serologische Reaktionen auf Lues auszu-  
arbeiten. Der von NELSON entwickelte *Treponema pallidum*-Immunadhärenztest zeigte zwar recht befriedigende Ergebnisse; ist jedoch in der Durchführung verhältnismäßig kompliziert und mit zahlreichen Fehlermöglichkeiten behaftet. Die *Agglutinationsreaktion mit Trep. pall.* ist zwar technisch einfacher durchzuführen, besitzt jedoch durch die Anwesenheit unspezifischer Agglutinine, die in zeitraubenden Absorptionsversuchen von spezifischen Antikörpern getrennt werden müssen, Faktoren, die den praktischen Wert dieser Reaktion mindern. In den letzten Jahren wurden bis auf Komplement-Bindungsreaktionen mit Kulturspirochaetales (REITER), die wir nicht in die Gruppe spezifischer Antikörperreaktionen auf Lues einordnen können, keine Versuche beschrieben, die sich mit der Ausarbeitung einer spezifischen *Komplement-Bindungsreaktion mit Trep. pallidum* beschäftigen.

In eigenen zahlreichen Versuchen arbeiteten wir eine *Komplement-Titerbestimmung* aus, die den quantitativen Nachweis einer Bindung des Komplements im T.P.I.-Test ermöglichte. Nachdem wir die Technik des Nelson-Tests in den verschiedenen Variationen beherrschten, bemühten wir uns, eine Kontrolle dieser Reaktion auszuarbeiten. NELSON und MAYER haben gezeigt, daß virulente Treponemen aus den Testes syphilitischer Kaninchen, in einem Basalmedium aufgeschwemmt, bei Anwesenheit von frischem Komplement im T.P.I.-Test durch spezifische Antikörper im Serum von Luikern immobilisiert werden. Die Ablesung des Nelson-Tests im Dunkelfeld ist sehr zeitraubend und nicht ohne Fehlermöglichkeiten. In den meisten Instituten des Auslandes sind allein mit dieser Ablesung zwei Ärzte mehrere Stunden beschäftigt. Nach der Durchführung des Nelson-Tests wird in einer Kontrolle festgestellt, ob in der 1. Serie mit aktivem Komplement in allen Versuchsröhrchen noch ein Überschuß an freiem Komplement nachweisbar ist und ob in der Kontrollserie kein wirksames Komplement vorhanden ist. Man gibt also nach Ablesen des Versuches im Dunkelfeld zu allen Seren hämolytisches System, d. h. Hammelblutkörperchenauf-

schwemmung und Amboceptor, hinzu. In der 1. Serie muß auf Grund des freien Komplements eine vollständige Hämolyse, in der Kontrollserie darf keine Hämolyse eintreten. Dieser Nachversuch ist für die Bewertung der abgelesenen Ergebnisse wichtig. Man kann nur durch diesen Nachweis feststellen, ob im Hauptversuch ein scheinbar zweifelhaftes oder falsches negatives Ergebnis aufgetreten ist. Diese falschen Ergebnisse können 1. durch zu wenig Komplement, 2. durch Komplement hemmende Faktoren im Serum, 3. durch zu viele Treponemen im Basalmedium im Verhältnis zum Antikörpertiter im Serum entstehen. In allen Fällen ist in den betreffenden Röhrchen der 1. Serie kein freies Komplement nachweisbar. Diese kurzen Ausführungen über die Komplementkontrolle nach Durchführung des Nelson-Tests sind zur Beurteilung der jetzt folgenden, von uns durchgeführten Versuche notwendig.

### 1. Komplement-Titerreaktion

NELSON und alle Nachuntersucher stellten fest, daß der T.P.I.-Test ohne aktives Komplement nicht durchführbar ist. Die Treponemen werden also nur dann immobilisiert, wenn ausreichend Komplement vorhanden ist. Von dieser Tatsache gingen unsere ersten Überlegungen aus. Wir untersuchten vor der Durchführung des T.P.I.-Tests den Komplementtiter in der 1. Serie nach Durchmischung von Treponemenaufschwemmung, Serum und Komplement. Nach der Durchführung des T.P.I.-Tests führten wir eine Komplementbestimmung durch, um den Titerabfall festzustellen. Auf Grund dieser Versuche mußte sich bei Berücksichtigung einer möglichst gleichen Anzahl von Treponemen je Kubikzentimeter der Antigenaufschwemmung bei allen positiven Seren ein Verlust an freiem Komplement nachweisen lassen. Wir stellten bei positiven Seren nach 18 Std im Durchschnitt einen Komplementtiterabfall von 8—10 Einheiten fest. Bei negativen Seren betrug der Komplementtiterabfall nach einem 18stündigen Aufenthalt im Brutschrank bei +35° C 2—4 Einheiten. Wenn der Komplementtiter am Beginn der Versuche 12—14 Einheiten betrug, so war der Titer nach Durchführung des Nelson-Tests bei den negativen Fällen auf 8—10 Einheiten gefallen. Bei den positiven Fällen sank der Titer von 12 auf 4 Einheiten und weniger ab. Bei einer größeren Anzahl von Treponemen je Kubikzentimeter fiel der

\* Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür ich an dieser Stelle nochmals danke.

Komplementtiter um mehr als 10 Einheiten. Für die Durchführung der Komplementauswertung arbeiteten wir folgende Versuchsanordnung aus:

Wir benutzten Reagensröhrchen von 8 cm Länge und 1 cm lichter Weite, die wir in Reihen zu je 20 Röhrchen aufstellten. In das 1. Röhrchen gaben wir 0,2 cm<sup>3</sup> der für den Nelson-Test benutzten Untersuchungsflüssigkeit (Treponemenaufschwemmung + Serum + aktives Komplement), hierzu 0,3 cm<sup>3</sup> physiologische NaCl-Lösung. In jedes weitere Röhrchen wurde 0,2 cm<sup>3</sup> physiologische NaCl-Lösung gegeben. Dann pipettierten wir nach Mischung des 1. Röhrchens 0,4 cm<sup>3</sup> aus dem 1. Röhrchen in das 2., mischten das 2. Röhrchen, gaben von dem 2. Röhrchen wiederum 0,4 cm<sup>3</sup> in das 3. Röhrchen, und so fort. Es befand sich dann in jedem Röhrchen der Verdünnungsreihe 0,2 cm<sup>3</sup> mit physiologischer NaCl-Lösung versetzter Untersuchungsflüssigkeit. Anschließend wurde in jedes Röhrchen 0,2 cm<sup>3</sup> Amboceptorverdünnung 1:1000 sowie 0,2 cm<sup>3</sup> einer 1%igen Hammelblutkörperchenaufschwemmung pipettiert. Nach Schütteln und 20 min Aufenthalt im Wasserbad bei +37°C wurde der Versuch abgelesen.

Die Bewertung der Komplementtitration wurde in der Weise vorgenommen, daß jeweils das letzte Röhrchen der Verdünnungsreihe, in dem noch eine vollständige Hämolyse aufgetreten war, als Titerwert angegeben wurde. Bei allen Seren führten wir gleichzeitig den T.P.I.-Test durch. Auf diese Weise war es möglich, die Ergebnisse der Komplement-Titerbestimmungen mit Hilfe des Ausfalls im T.P.I.-Test zu kontrollieren. Wir fanden bei Vergleichsuntersuchungen mit dem Nelson-Test die im folgenden beschriebenen Ergebnisse.

Bei der Durchführung eines T.P.I.-Tests werden folgende Kontrollen eingeschaltet:

1. Kontrolle
1. Röhrchen: Bekanntes negatives Serum + aktives Komplement + Treponemenaufschwemmung.
2. Röhrchen: Bekanntes negatives Serum + inaktives Komplement + Treponemenaufschwemmung.
2. Kontrolle
1. Röhrchen: Bekanntes positives Serum + aktives Komplement + Treponemenaufschwemmung.
2. Röhrchen: Bekanntes positives Serum + inaktives Komplement + Treponemenaufschwemmung.
3. Kontrolle
- Ochsen Serum-Ultrafiltrat + Treponemenaufschwemmung + aktives Komplement.

Wir untersuchten zuerst das Verhalten des Komplementtiters in der 1. Serie dieser Kontrollen (Tabelle 1).

Bei dem negativen Serum betrug der Komplementtiterabfall 2 Einheiten, bei dem positiven Serum 8 Einheiten. Bei der Kontrolle 3 ohne Serum wurde nach 18 Std Inkubation im Brutschrank von 35° C ein Komplementschwund von 1 Einheit festgestellt.

Für die Komplementauswertung ist die Kontrollserie mit inaktivem Komplement des Nelson-Tests ohne jede Bedeutung, so daß nur die ersten Röhrchen der Kontrollen 1 und 2 und das Kontrollröhrchen 3 vor und nach dem Test untersucht werden müssen. Auch für die weitere routinemäßige Untersuchung der übrigen Seren in der Komplement-Titerreaktion ist die Kontrollserie mit inaktivem Komplement unnötig.

Wir haben aus der Reihe unserer Vergleichsuntersuchungen zwischen dem Treponema pallidum-Immobilisierungstest und der Komplement-Titerreaktion einige Ergebnisse ausgewählt und in der Tabelle 2 aufgezeichnet.

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, ist in allen Fällen, in denen immobilisierende Antikörper im Serum vor-

handen waren, ein deutlicher Komplement-Titerabfall von 7—9 Einheiten festzustellen. In einzelnen Fällen erhielten wir bei einem zweifelhaften Ausfall im T.P.I.-Test ein positives oder negatives Ergebnis in der Komplement-Titerreaktion. Bei den T.P.I.-negativen Seren stellten wir einen Komplement-Titerabfall bis maximal 4 Einheiten fest. Wir erhielten auch dann eindeutige Ergebnisse in der Komplement-Titerreaktion, wenn der Treponema pallidum-Immobilisierungstest durch die Anwesenheit treponemicider Substanzen im Patientenserum nicht durchführbar war. Auch in diesen Fällen war eine Reaktion zwischen Treponemen und immobilisierenden Antikörpern unter Komplement-

Tabelle 1. Vergleich der Ergebnisse des Nelson-Tests und der Komplement-Titerbestimmung bei Kontrollen

| Kontrollen                    | Nelson-Test | Komplement-Titerbestimmung |                      |           |          |
|-------------------------------|-------------|----------------------------|----------------------|-----------|----------|
|                               |             | vor dem T.P.I.-Test        | nach dem T.P.I.-Test | Differenz | Ergebnis |
|                               |             | Einheit                    | Einheit              | Einheit   |          |
| 1. Kontrolle, 1. Röhrchen . . | negativ     | 12                         | 10                   | 2         | negativ  |
| 2. Kontrolle, 1. Röhrchen . . | positiv     | 12                         | 4                    | 8         | positiv  |
| 3. Kontrolle . . . . .        | negativ     | 12                         | 11                   | 1         | negativ  |

bindung eingetreten, die in der Komplement-Titerbestimmung aufgedeckt werden konnte. Die Ergebnisse unserer Versuche einer Bestimmung des Komplementtiters vor und nach dem T.P.I.-Test zeigten eine weitgehende Übereinstimmung mit den Resultaten des

Tabelle 2. Vergleichsuntersuchungen zwischen Nelson-Test und Komplement-Titerreaktion

| Serum Nr. | Nelson-Testergebnis | Komplement-titer |                   | Differenz Komplement | Ergebnis |
|-----------|---------------------|------------------|-------------------|----------------------|----------|
|           |                     | vor dem TPI-Test | nach dem TPI-Test |                      |          |
|           |                     | Einheiten        | Einheiten         | Einheiten            |          |
| 248       | δ 90 positiv        | 12               | 4                 | 8                    | positiv  |
| 264       | δ 0 negativ         | 12               | 9                 | 3                    | negativ  |
| 265       | δ 50 zweifelhaft    | 12               | 9                 | 3                    | negativ  |
| 280       | δ 100 positiv       | 11               | 2                 | 9                    | positiv  |
| 294       | δ 80 positiv        | 12               | 4                 | 8                    | positiv  |
| 299       | δ 26 zweifelhaft    | 12               | 5                 | 7                    | positiv  |
| 304       | δ 90 positiv        | 12               | 4                 | 8                    | positiv  |
| 305       | δ 0 negativ         | 12               | 8                 | 4                    | negativ  |

T.P.I.-Tests und ermöglichten eine Kontrolle der Ablesung im Dunkelfeld. Da die Komplement-Titerbestimmungen trotz der verhältnismäßig einfachen Technik nur unter erheblichem Material- und Zeitaufwand durchzuführen sind, bemühten wir uns in weiteren Versuchen, geeignete Konzentrationen von Serum, Komplement und Treponemenaufschwemmung zu finden, die es uns gestatten sollten, schon kurze Zeit nach Hinzufügen der Treponemensuspension zu dem Serum und Komplement eine spezifische Komplement-Bindungsreaktion abzulesen.

2. Komplement-Bindungsreaktionen mit Treponemata pallida

Da es bisher nicht gelungen war, virulente Treponemata pallida zu züchten, um auf diese Weise in rationaler Art zu einem Antigen zu gelangen, bemühten wir uns, virulente Treponemen aus Kaninchenhoden zu gewinnen und damit eine spezifische Komplement-

Bindungsreaktion anzusetzen. Die Antigengewinnung war — wie zu erwarten — recht schwierig. Zwei Punkte mußten vor allem berücksichtigt werden: 1. Treponemen zu erhalten, die nicht schon in vivo vorsensibilisiert waren; 2. virulente Treponemen soweit von Hodensubstanzen und Verunreinigungen zu befreien, daß die Komplement-Bindungsreaktion ausschließlich abhängig von der Anwesenheit virulenter Treponemen war.

Tabelle 3. Gegenüberstellung der einzelnen Komponenten, die für die Treponemen-K.B.R. und den T.P.I.-Test benötigt werden

| Komplement-Bindungsreaktion                                                        | T.P.I.-Nelson-Test                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,25 cm <sup>3</sup> inaktives Serum (1 : 5)                                       | 0,05 cm <sup>3</sup> inaktives Serum unverdünnt                                         |
| 0,25 cm <sup>3</sup> Treponemenantigen unverdünnt, etwa 20 Treponemen je Blickfeld | 0,35 cm <sup>3</sup> Treponemenantigen unverdünnt, etwa 6 bis 8 Treponemen je Blickfeld |
| 0,25 cm <sup>3</sup> Komplement 6 bis 9%                                           | 0,15 cm <sup>3</sup> Komplement unverdünnt                                              |
| 0,5 cm <sup>3</sup> hämolytisches System                                           | —                                                                                       |

Um eine Vorsensibilisierung zu vermeiden, wurden die Testes der Kaninchen nicht später als 8 Tage nach der Inokulation mit virulenten Treponemen extirpiert. Es wurden 10 longitudinale und 1 transversaler Schnitt je Hoden geführt. In 40 cm<sup>3</sup> physiologischer NaCl-Lösung wurden die Testes unter anaeroben Bedingungen 2 Std bei 35° C geschüttelt. Anschließend wurde 1 min bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert, um Spermatozoen, Erythrocyten, Lymphocyten und Gewebetrümmer zu entfernen. Die überstehende Flüssigkeit wurde in ein anderes Zentrifugenröhrchen abgegossen und das Sediment verworfen. Die treponemenhaltige Flüssigkeit wurde 1 Std bei 56° C gehalten und die Treponemen auf diese Weise durch Hitze abgetötet. Anschließend wurde die Treponemensuspension durch ein G 3-Filter gezogen und das Filtrat bei 4000 Touren zentrifugiert. Das Sediment wurde wiederum in 40 cm<sup>3</sup>

20—30 Treponemen je Blickfeld. Es wurden Vorversuche zur Komplement- und Amboceptor-Titerbestimmung durchgeführt. Eine Antigenverdünnung wurde bei dieser Treponemensuspension nicht vorgenommen, da es sich auf Grund von Vorversuchen gezeigt hatte, daß brauchbare Antigene 20—30 Treponemen je Blickfeld bei einer Vergrößerung von 1 : 500 enthalten müssen. Eine Antigen suspension, in der 40—50 Treponemen je Blickfeld vorhanden sind, muß im Verhältnis 1 : 1 mit phenolisierter (0,3%) physiologischer NaCl-Lösung verdünnt werden. Die zu untersuchenden Seren werden 30 min bei 56° C inaktiviert. Von jedem Patientenserum wird eine Serumkontrolle angesetzt, um die Eigenhemmungsneigung eines Serums bei Anwesenheit des Antigens festzustellen. In die Kontrollröhrchen wird zu diesem Zweck statt des Treponemenantigens eine gleiche Menge phenolisierter, physiologischer NaCl-Lösung eimpipettiert. Bei jedem Versuch werden bekannte positive und negative Seren zur Kontrolle mituntersucht.

Die für die Komplement-Bindungsreaktion mit Treponemata pallida benutzten Reagentien sind im Vergleich zu den im Nelson-Test benötigten in Tabelle 3 aufgeführt. In Vorversuchen stellten wir fest, daß dieses Verhältnis der einzelnen Komponenten zueinander notwendig ist, um spezifische und sensible Ergebnisse in der Komplement-Bindungsreaktion zu erzielen.

Serumverdünnung, Antigenlösung und Komplement werden in die einzelnen Röhrchen pipettiert und gemischt. Die Röhrchen werden dann für 1/2 Std in den Kühlschrank bei +4—6° C gegeben. Nach dieser Zeit werden sie 30 min bei 37° C in das Wasserbad gestellt. Anschließend wird 0,5 cm<sup>3</sup> des hämolytischen Systems in jedes Röhrchen pipettiert und der Versuch wiederum 1/2 Std in das Wasserbad von 37° C gegeben. Die Ablesung erfolgt in der Weise, wie sie in der Reichsvorschrift von 1934 angegeben ist.

Wir führten Vergleichsuntersuchungen mit der Treponema pallidum-Komplement-Bindungsreaktion, der Spirochaetales-Eiweißreaktion, der Meinicke-Klärungsreaktion II und dem Nelson-Test durch. Von besonderem Interesse war die Frage, ob eine Übereinstimmung

Tabelle 4. Vergleichsuntersuchungen mit der Treponemen-K.B.R., der S.E.R., der M.K.R. II und dem T.P.I.-Test

| Serum Nr. | Diagnose                                      | Trep.K.B.R. | S.E.R. | M.K.R.II | T.P.I.-Test |
|-----------|-----------------------------------------------|-------------|--------|----------|-------------|
| 132       | Lues II . . . . .                             | ++++        | ++++   | ++++     | positiv     |
| 240       | Lues latens . . . . .                         | ++++        | ++++   | ++++     | positiv     |
| 247       | Lues latens . . . . .                         | +           | —      | —        | positiv     |
| 327       | Ekzem . . . . .                               | —           | ++     | +        | negativ     |
| 452       | Ekzem . . . . .                               | —           | —      | —        | negativ     |
| 458       | Psoriasis . . . . .                           | —           | —      | —        | negativ     |
| 460       | Lues latens . . . . .                         | +++         | —      | —        | positiv     |
| 464       | Acne vulgaris . . . . .                       | —           | —      | —        | negativ     |
| 478       | Lues II . . . . .                             | ++++        | ++++   | ++++     | positiv     |
| 479       | Dermatitis . . . . .                          | —           | —      | —        | negativ     |
| 508       | Lues latens . . . . .                         | +           | +++    | ++++     | positiv     |
| 512       | Akrodermatitis chronica atrophicans . . . . . | —           | —      | —        | negativ     |
| 524       | Lues I . . . . .                              | ++++        | +++    | +++      | positiv     |
| 528       | Lues III . . . . .                            | +++         | ++++   | ++++     | positiv     |
| 538       | Urticaria . . . . .                           | —           | —      | —        | negativ     |
| 541       | Lues latens . . . . .                         | ++          | —      | ++++     | positiv     |
| 547       | Lues latens . . . . .                         | —           | ++++   | ++++     | positiv     |
| 560       | Lues latens . . . . .                         | —           | —      | +++      | positiv     |
| 569       | Akrodermatitis chronica atrophicans . . . . . | —           | ++++   | —        | negativ     |
| 580       | Lues latens . . . . .                         | ++++        | ++     | ++++     | positiv     |

physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen und nochmals 1 Std bei 4000 Touren zentrifugiert. Auf diese Weise wurden die Treponemen noch 3mal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das Treponemensediment in 10 cm<sup>3</sup> physiologischer NaCl-Lösung mit einem Gehalt von 0,3% Phenol aufgenommen. Der Phenolzusatz wurde in Anlehnung an die Arbeiten von GAEHTGENS gewählt, der nachgewiesen hatte, daß Phenol zu einer Sensibilisierung der Komplementbindung mit wäßrigem Spirochaetalesantigen führt. Im Dunkelfeldpräparat zeigten sich

der Ergebnisse mit einem wäßrigen Antigen aus Treponemata pallida (NICHOLS) und einem wäßrigen Antigen aus Kulturspirochaetales (REITER) besteht. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die positiven und negativen Ausfälle der Treponemen-K.B.R. durch den T.P.I.-Test bestätigt wurden. Wir haben aus der Reihe unserer Versuche 21 Fälle ausgewählt und in der Tabelle 4 aufgeführt.

Es zeigte sich, daß zwischen einem spezifischen Antigen aus Treponemata pallida (NICHOLS) und einem Antigen aus apathogenen Spirochaetales (REITER) in den Resultaten bei Verwen-

dung in einer Komplement-Bindungsreaktion keine völlige Übereinstimmung bestand, obwohl in beiden Fällen die technische Durchführung der Reaktion weitgehend übereinstimmte. Wären die Resultate in einer der beiden Reaktionen grundsätzlich schwächer gewesen als in der anderen, so hätte man daraus schließen können, daß zwar dieselben Antikörper nachgewiesen wurden, daß die Sensibilität jedoch unterschiedlich

sei. Die Komplement-Bindungsreaktion mit apathogenen Spirochaetales zeigt bei Akrodermatitis in einzelnen Fällen einen isoliert positiven Ausfall. In diesen Fällen war die K.B.R. mit *Treponemata pallida* eindeutig negativ. Inwieweit unspezifische Faktoren den Ausfall der K.B.R. mit einem Antigen aus *Treponemata pallida* beeinflussen, muß durch weitere Versuche geklärt werden.

Auffallend ist die weitgehende Übereinstimmung der Treponemen-K.B.R. mit dem T.P.I.-Test. In einzelnen Fällen behandelter Lues latens beobachteten wir allerdings einen negativen Ausfall in der Treponemen-K.B.R., bei einem gleichzeitig positiven Ergebnis im T.P.I.-Test. Dieser Ausfall ließe sich durch eine geringere Sensibilität der Treponemen-K.B.R. erklären. Es ist anzunehmen, daß die Sensibilität dieser Reaktion noch gesteigert werden kann.

Die Schwierigkeit der Antigengewinnung für die Treponemen-K.B.R. verhindert vorerst größere Untersuchungsreihen. Die Beeinflussung der Ausfälle in der Treponemen-K.B.R. durch in vivo vorsensibilisierte Treponemen versuchten wir durch frühzeitige Extirpation der Testes syphilitischer Kaninchen auszuschießen. Hierdurch war einerseits die Ausbeute an Treponemen geringer, andererseits jedoch die Gewähr gegeben, daß die Reaktion durch keine unspezifischen Faktoren beeinflusst wurde. Diese Versuche sollten dazu beitragen, die serologische Diagnostik mit Hilfe eines spezifischen Antigens in der Komplement-Bindungsreaktion zu vervollständigen.

Bis auf den *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest sind die übrigen spezifischen Antigen-Antikörperreaktionen bei Lues mit *Treponema pallidum*, so die Agglutinationsreaktion, der *Treponema pallidum*-Immun-Adhärenztest und die Komplement-Bindungsreaktion noch in einem Versuchsstadium.

*Zusammenfassung.* Eigene Versuche werden beschrieben, die zur Ausarbeitung einer Komplement-Titerreaktion und einer Komplement-Bindungsreaktion mit abgetöteten *Treponemata pallida* führten. Eine genaue Komplement-Titerbestimmung vor und nach Durchführung des T.P.I.-Tests ermöglicht es, die Ergebnisse der spezifischen Immobilisierung zu kontrollieren. Die Resultate des Komplement-Titer-

abfalls und der Immobilisierung virulenter Treponemen stimmen weitgehend überein. Treponemicid wirkende Substanzen im Serum verhindern auf Grund einer unspezifischen Immobilisierung eine Ablesung des Nelson-Tests. Trotz der Anwesenheit dieser treponemiciden Substanzen im Patientenserum erhielten wir auch in diesen Fällen verwertbare Ergebnisse in der Komplement-Titerreaktion. Die routinemäßige Durchführung der Komplement-Titerbestimmungen ist jedoch trotz der einfachen Technik infolge eines erheblichen Material- und Zeitaufwandes wesentlich erschwert.

Die Antigengewinnung und die Technik einer Komplement-Bindungsreaktion mit abgetöteten *Treponemata pallida* werden bekanntgegeben. Vergleichsuntersuchungen zwischen der von uns ausgearbeiteten *Treponemata pallida*-Komplement-Bindungsreaktion, der Spirochaetales-Eiweißreaktion, der Meinicke-Klärungsreaktion II und dem *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest werden aufgeführt und die Ergebnisse diskutiert. Es besteht eine weitgehende Übereinstimmung zwischen der Komplement-Bindungsreaktion mit *Treponemata pallida* und dem T.P.I.-Test. Unspezifische Ausfälle in der S.E.R. und der M.K.R. II werden sowohl durch die Treponemen-K.B.R. als auch durch den Nelson-Test erkannt. Die Sensibilität der Treponemen-K.B.R. ist nach unseren bisherigen Erfahrungen geringer als die des Nelson-Tests. Die Schwierigkeit der Antigengewinnung für diese neue spezifische Reaktion verhindert vorerst größere Untersuchungsreihen. Die serologische Diagnostik wird durch die Anwendung einer spezifischen Komplement-Bindungsreaktion weiter vervollständigt. Der *Treponema pallidum*-Immun-Adhärenztest, die Agglutinationsreaktion und die Komplement-Bindungsreaktion mit abgetöteten *Treponemata pallida* sind für Routineuntersuchungen noch nicht in gleicher Weise verwertbar wie der *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest.

*Literatur.* GAEHTGENS, W.: Med. Klin. 1929, 390. — MEINICKE, K.: Hautarzt 4, 268 (1953). — NELSON, R. A.: Hautarzt 3, 436 (1952). — NELSON, R. A., and M. MAYER: J. of Exper. Med. 89, 369 (1949).

*Anschrift:* Priv. Doz. Dr. K. MEINICKE, München 15, Dermatologische Univ.-Klinik, Frauenlobstr. 9



Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. A. MARCHIONINI)

## Die Bedeutung der Treponemen-Antigen-Antikörper-Reaktionen für die Diagnose der Lues\*

Von KURT MEINICKE

Mit 1 Textabbildung

Bei der Serologie der Lues müssen wir grundsätzlich drei Gruppen von Antikörpern bzw. Reaginen unterscheiden:

1. Die Gruppe der Lipoidreagine, die wir in den klassischen serologischen Reaktionen nachweisen,

2. die Gruppe der Treponemen-Proteinantikörper (Spirochaetales-Eiweißantikörper), die wir in der sog. „Pallida“-Reaktion und in der Spirochaeten-Agglutinationsreaktion erkennen,

3. die Gruppe der spezifischen Immunantikörper, die in den einzelnen Reaktionen mit *Treponema pallidum* reagieren.

Zusätzlich zu den an anderer Stelle beschriebenen Differenzierungen der verschiedenen Reagine und Antikörper und den Ergebnissen unserer eigenen Absorptionsversuche gelang es VAISMANN und HAMELIN zu beweisen, daß eine Trennung der Reagine und Antikörper auch mit der Hilfe der Ultrazentrifuge möglich ist. Unter Berücksichtigung der Arbeiten von PAIC trennten sie die verschiedenen Faktoren der Serumproteine. Durch Zentrifugieren eines positiven Serums bei 80000 Umdrehungen in der Minute gelang es ihnen, nach 46—48 Std die Lipoidreagine zu sedimentieren, so daß die überstehende Flüssigkeit lediglich noch die leichteren immobilisierenden Antikörper enthielt. In neuester Zeit haben EHRMANN und SANDLER durch Absorptionsversuche nachgewiesen, daß sowohl lebende als auch tote *Treponemata pallida* immobilisierende Antikörper zu absorbieren vermögen. Weiterhin gaben sie an, daß nach Zusatz von Cardiolipin ein — wenn auch geringerer — Schwund von Immobilisinen zu beobachten sei. Diese zuletzt angeführten Ergebnisse bedürfen jedoch noch der Nachprüfung und Bestätigung.

### Serumuntersuchungen

Wir haben in den letzten Jahren mit dem *Treponema pallidum*-Immobilisierungstest (Nelson-Test) 1850 Untersuchungen durchgeführt. Wir werden jedoch im folgenden nur diejenigen Untersuchungsergebnisse berücksichtigen, die einen Aufschluß über die Anwesenheit der drei verschiedenen Antikörper- bzw. Reagingruppen im Serum gestatten. 858 Seren konnten wir sowohl in den Lipoidbindungsreaktionen als auch in der Spirochaetales-Eiweißreaktion (SER, „Pallida“-Reaktion) und im TPI-Nelson-Test vergleichsweise untersuchen. Unabhängig von Diagnose und Therapie ermittelten wir die in Tabelle 1 aufgeführten Befunde.

Tabelle 1. Vergleichende Untersuchungen im Nelson-Test, den Lipoidbindungsreaktionen und der SER („Pallida“-Reaktion)

|                     | TPI-Test | Wa.R. | MKR II | Citochol | SER |
|---------------------|----------|-------|--------|----------|-----|
| Positiv . . . . .   | 462      | 284   | 406    | 412      | 324 |
| Negativ . . . . .   | 324      | 574   | 452    | 446      | 534 |
| Zweifelhaft . . . . | 72       | —     | —      | —        | —   |
| Gesamtzahl          | 858      | 858   | 858    | 858      | 858 |

\* Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür ihr auch an dieser Stelle nochmals gedankt sei.

Aus diesen Zahlen kann lediglich die Tatsache erkannt werden, daß im gesamten gesehen bei unbehandeltem und behandelter Lues der Nelson-Test häufiger positiv ist als die Lipoidbindungsreaktionen und die Spirochaetales-Eiweißreaktion. Erst die Aufschlüsselung dieser Ergebnisse ermöglicht die Beurteilung des diagnostischen Wertes der einzelnen Reaktionen. Wir untersuchten 223 Seren von Personen, die bisher noch nicht antiluisch behandelt waren, und bei denen außer positiven Lipoidbindungsreaktionen bzw. einer positiven SER anamnestisch und klinisch keine Zeichen einer bestehenden oder durchgemachten Lues zu finden waren. Diese 223 Seren wurden aus einer Gesamtzahl von 10534 Seren ausgewählt, die im Verlauf eines Jahres im serologischen Laboratorium der Universitäts-Hautklinik untersucht wurden.

Wir fanden die in Tabelle 2 protokollierten positiven und negativen Ausfälle in den einzelnen Reaktionen.

Tabelle 2. Ausfall der einzelnen Reaktionen bei fraglicher Lues latens

|                     | TPI-Test | Wa.R. | MKR II | Citochol | SER |
|---------------------|----------|-------|--------|----------|-----|
| Positiv . . . . .   | 99       | 70    | 123    | 121      | 81  |
| Negativ . . . . .   | 80       | 153   | 100    | 102      | 142 |
| Zweifelhaft . . . . | 44       | —     | —      | —        | —   |
| Gesamtzahl          | 223      | 223   | 223    | 223      | 223 |

Spezifische, *Treponema pallidum*-immobilisierende Antikörper wurden in 99 Seren nachgewiesen. In 80 Fällen, in denen eine oder mehrere der Lipoidbindungsreaktion bzw. die SER positiv gewesen waren, erhielten wir im Nelson-Test einen negativen Befund. 44 Seren reagierten auch bei Wiederholung im Nelson-Test zweifelhaft. Es handelte sich bei der letzten Gruppe meist um Seren, die uns von verschiedenen Ärzten außerhalb Bayerns zugeschickt wurden und die teils bakteriell verunreinigt, teils durch Überalterung verändert waren. Auffallend war, daß von den 99 Patienten mit Lues latens, in deren Seren spezifische Antikörper nachweisbar waren, die wenigsten in der Wa.R. und in der SER positiv reagierten. Diese Befunde stimmen jedoch völlig mit den Ergebnissen bei experimenteller Kaninchensyphilis überein. Auch hier fanden wir bei infizierten, unbehandelten Tieren, daß nach einem vorübergehenden Anstieg in allen Reaktionen nach etwa einem Jahr eine größere Anzahl unspezifisch negativer Ausfälle in der Wa.R. und in der SER zu beobachten war. Die Flockungsreaktionen MKR II und Citochol zeigten größere Übereinstimmung mit dem Nelson-Test als die Komplexbindungsreaktionen. Wir haben grundsätzlich derartige Ergebnisse unserer Untersuchungen sowohl in den Lipoidbindungsreaktionen und in der SER als auch im Nelson-Test wiederholt, um gerade in diesen wichtigen Zweifelsfällen eine endgültige Klarheit in serologisch-diagnostischer Hinsicht zu erlangen. Die Erkennung unbehandelter Lues latens-Fälle ohne sichere

*klinische Zeichen ist nach den Berichten von NELSON, REYN, NIELSEN, DUREL u. a. und unseren eigenen Erfahrungen häufig nur mit Hilfe des Nachweises spezifischer Antikörper im TPI-Test möglich.* Während der ganzen Latenzperiode der Lues, in der einzelne klassische Reaktionen und auch die SER negativ sein können, ist der Nelson-Test immer positiv. Andererseits sind unspezifisch positive Ausfälle, wie wir sie in den klassischen Reaktionen und der SER bei nicht-luischen Patienten in 0,5—1 % fanden, bisher im TPI-Test nicht beobachtet worden. Es ist heute mit Hilfe des spezifischen Antikörpernachweises im Nelson-Test möglich, gerade in diesen schwer zu beurteilenden Fällen Klarheit zu gewinnen.

Bei Patienten mit Akrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer stellte GRÜNEBERG in einzelnen Fällen isoliert positive Ausfälle in der SER fest. Bei den von uns durchgeführten Nachuntersuchungen erhielten wir das in Tabelle 3 wiedergegebene Resultat.

Tabelle 3. *Unspezifische Ausfälle in der Spirochaetales-Eiweißreaktion und in den Lipoidbindungsreaktionen bei Akrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer*

|                  | TPI-Test | Wa.R. | MKR II | Citochol | SER |
|------------------|----------|-------|--------|----------|-----|
| Positiv. . . . . | —        | —     | 1      | 1        | 4   |
| Negativ. . . . . | 35       | 35    | 34     | 34       | 31  |
| Gesamtzahl       | 35       | 35    | 35     | 35       | 35  |

Auf Grund des negativen Ausfalls des TPI-Tests gelang uns der Nachweis, daß die positiven Ausfälle bei Akrodermatitis in der SER und in den Lipoidbindungsreaktionen unspezifischer Natur waren. In keinem Fall von 35 Seren der Patienten mit dieser ätiologisch noch unklaren Dermatoze konnten wir bei Untersuchung im Treponema-pallidum-Immobilisierungstest einen positiven Ausfall beobachten.

Einige besonders auffallende Ergebnisse möchten wir im einzelnen erläutern.

Bei der Patientin Herta B., bei der sowohl die Wa.R. als auch die MKR II und die Citocholreaktion positiv ausfielen, zeigte sich auch bei wiederholten Untersuchungen ein negatives Ergebnis im TPI-Test. Die Patientin litt an einer Endocarditis lenta. In den klassischen Reaktionen blieben auch bei wiederholten Kontrollen die positiven Befunde bestehen. Sie schwankten in der Wa.R. zwischen zweifelhaft und ++, in der MKR II zwischen ++ und +++ und in der Citocholreaktion ebenfalls zwischen ++ und +++.

Das Serum des Patienten Josef K. mit Morbus Hodgkin reagierte in der Wa.R. ++, in der Müller-Ballungsreaktion ++ und in der MKR +. Der Nelson-Test war auch hier bei mehrmaliger Kontrolle eindeutig negativ, ebenfalls die SER.

Ein weiteres Serum, das uns aus Coburg zugeschiedt wurde, zeigte folgendes Ergebnis: Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin ++, MKR II ++, Citochol ++, SER +. Auch hier war der Nelson-Test trotz wiederholter Versuche eindeutig negativ.

Ein weiterer Fall, der uns von der hiesigen Medizinischen Klinik überwiesen wurde, zeigte in den klassischen Reaktionen und in der SER folgendes Bild: Wa.R. +++, MKR +++, Citochol +++, SER ++. Auch hier war der Nelson-Test negativ.

Es war bisher immer recht schwierig, die Spezifität einer der gebräuchlichen Reaktionen festzustellen. Man konnte letztlich nur anamnestische Angaben verwerten bzw. klinische Untersuchungsergebnisse für die Bestätigung oder Ablehnung der serologischen Befunde heranziehen. Der Verifikationstest von KAHN und auch der Ausschlußtest von NEURATH und VOLKLIN führten

in den meisten Fällen zu keiner eindeutigen Klärung der Befunde. Erst seit Einführung des Nelson-Tests ist es möglich, die Sensibilität und Spezifität der klassischen Reaktionen und der SER zu kontrollieren.

Im Vergleich zu dem amerikanischen Schrifttum finden wir in Deutschland wesentlich weniger unspezifische Ausfälle in den klassischen Methoden. In den USA verwendet man besonders stark eingestellte Extrakte, die bei großer Sensibilität eine erhöhte Quote unspezifisch positiver Reaktionsausfälle zeigen. Lediglich in der Nachkriegszeit wurden auch bei uns vermehrt unspezifische positive Ausfälle festgestellt, die jedoch in erster Linie auf schlecht eingestellte Antigene, besondere Serumlabilität auf Grund von Mangelernährung und technische Fehler zurückzuführen waren.

Zur Verhinderung der Spätfolgen der Lues sind die Fälle von größter Bedeutung, in denen bei völlig negativen klassischen Reaktionen und negativer SER ein positiver TPI-Test gefunden wird. Die Schwierigkeit der technischen Durchführung des TPI-Tests und die Kostspieligkeit der Methode verhindern heute noch größere Reihenuntersuchungen. Die Zahlen, die wir vom statistischen Landesamt in Bayern erhielten, lassen erkennen, wie groß die Durchseuchung der Bevölkerung mit Lues ist. Es muß jedoch hierbei vorausgeschickt werden, daß die in Tabelle 4 aufgeführten Zahlen über neu erfaßte Lues- und Gonorrhoe-Fälle in Bayern mit Sicherheit zu niedrig sind. Es wurden nur Patienten aufgeführt, die dem Gesundheitsamt von Kliniken und Venerologen gemeldet wurden. In der ersten Hälfte des Jahres 1945 wurden solche Meldungen kaum durchgeführt. Es ist zu bedenken, daß die Verbreitung des Lues gerade während dieser Zeit wohl ihren Höhepunkt erreichte. So finden wir für das Jahr 1945 lediglich 7000 gemeldete, neu erfaßte Luesfälle, im Jahre 1946 jedoch über 20000. Es ist anzunehmen, daß die wirkliche Zahl der neu erfaßten Fälle im Jahre 1945 die des Jahres 1946 wesentlich übersteigt. Eine gesetzliche Meldepflicht besteht seit 1954 nicht mehr, so daß man für die jetzt folgenden Jahre lediglich Schätzungen im Hinblick auf neu erfaßte Luesfälle vornehmen kann.

Tabelle 4. *Verbreitung der Lues und Gonorrhoe in Bayern*

| Jahr      | Neu erfaßte Fälle |           |
|-----------|-------------------|-----------|
|           | Lues              | Gonorrhoe |
| 1945      | 7274              | 19383     |
| 1946      | 20559             | 59178     |
| 1947      | 21392             | 42709     |
| 1948      | 15697             | 27072     |
| 1949      | 10772             | 18150     |
| 1950      | 8194              | 10856     |
| 1951      | 4800              | 7354      |
| 1952      | 4251              | 7187      |
| Insgesamt | 92939             | 191884    |

Zur Durchuntersuchung größerer Bevölkerungskreise eignet sich nach den bisherigen Erfahrungen, über die HÄMEL, E. MEINKE und FISCHER, K. MEINKE, DAHR u. a. berichtet haben, am besten die Trockenblut-MKR II. In allen Fällen, in denen ein positiver Befund in dieser Suchreaktion erhoben wird, erscheint uns vor der Behandlung eine Kontrolle im Nelson-Test unter allen Umständen erforderlich. Seit 1951 haben wir die Graviden der Münchener Universitäts-

Frauenkliniken untersucht und fanden bei insgesamt 14864 Schwangeren in 0,8% einen positiven Ausfall in der Meinicke-Trockenblut-MKR II. Bis auf 2 Fälle waren bei einer Kontrolle in den Lipoidbindungsreaktionen, der SER und im Nelson-Test, die in der Trockenblut-MKR II erfaßten Fälle übereinstimmend in allen Reaktionen positiv. Durch eine rechtzeitige Behandlung der Graviden kann in fast allen Fällen eine Übertragung der Erreger auf den Fetus und eine Erkrankung der Neugeborenen verhindert werden.

Von ganz besonderem Interesse erscheinen uns in diesem Zusammenhang 3 Fälle, die wir im folgenden näher beschreiben:

1. Waltraut W. wurde uns von der Kinderklinik mit klinischen Zeichen einer Lues connata überwiesen. Die Seroreaktionen fielen wie folgt aus: Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin +++++, MKR II +++++, Citochol +++++, SER +++++, Meinicke-Einheiten 256, Nelson-Test positiv. Wir untersuchten daraufhin die Mutter dieses Kindes, bei der wir klinisch keinerlei Zeichen einer bestehenden oder durchgemachten Lues feststellen konnten. In den klassischen Reaktionen und in der SER waren die Ergebnisse trotz dreimaliger Wiederholungen vollständig negativ. Der zur Kontrolle durchgeführte Nelson-Test fiel positiv aus. Die Behandlung der Mutter wurde daraufhin mit 14 Mill. E Penicillin eingeleitet. Unter dieser Therapie wurden auch die klassischen Reaktionen und die SER positiv und zeigten 4 Wochen nach Beginn der Behandlung folgende Ergebnisse: Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin ++, MKR II +++++, Citochol ++, SER +.

2. Von der Augenklinik wurde uns Hermine M. zugeschickt, die im Alter von 15 Jahren wegen einer Keratitis parenchymatosa mit 3 Neo-Salvarsan-Wismut-Kuren behandelt worden war. Nach Beendigung der Salvarsan-Wismut-Kuren waren die klassischen Reaktionen negativ ausgefallen. Nach anfänglicher Besserung des klinischen Befundes traten 5 Jahre später auf dem rechten Auge Erscheinungen auf, die zur Erblindung führten. Bei der von uns durchgeführten serologischen Untersuchung ergab sich folgender Befund: Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin negativ, MKR II ++, Citochol ++, SER negativ. Der Nelson-Test fiel bei mehrmaliger Wiederholung positiv aus. Besonders auffallend ist hier der negative Befund in der SER und in der Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin. Wir untersuchten die Mutter dieses Mädchens, bei der in den vergangenen Jahren bei an anderen Stellen durchgeführten serologischen Kontrollen stets negative Befunde festgestellt wurden. Die Patientin war bis jetzt unbehandelt. Die bei uns durchgeführten serologischen Kontrollen ergaben folgendes Bild: Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin +++++, MKR II +++++, Citochol +++++, SER +++++, Nelson-Test positiv.

3. Rolf A. Neben klinischen Zeichen einer Lues connata wurden bei diesem Kind folgende Reaktionen festgestellt: Wa.R., Cardiolipin und Sitolipin +++++, MKR II +++++, Citochol +++++, SER +++++, Meinicke-Einheiten 521, Nelson-Test positiv. Die Mutter zeigte klinisch keine Zeichen einer bestehenden oder durchgemachten Lues. Die serologischen Befunde waren: Wa.R., Cardiolipin und Sitolipin, MKR II, Citochol und SER negativ, Nelson-Test positiv.

Diese 3 Fälle sind deshalb von besonderer Bedeutung, weil es hier mit Hilfe des Nachweises spezifischer immobilisierender Antikörper erstmalig möglich war, mit Sicherheit luische Erkrankung der Mütter zu diagnostizieren. Die Durchführung des Nelson-Tests ist für alle Untersuchungen der Mütter lueskranker Kinder, insbesondere, wenn die Erkrankung erst 10 oder 20 Jahre nach der Geburt aufgedeckt wird und die Diagnose Lues connata nicht mit Sicherheit gestellt werden kann, unbedingt erforderlich.

Bei einer weiteren Gruppe von Patienten ließ die Durchführung des TPI-Tests besondere Aufschlüsse erwarten. Es handelte sich hierbei um die Untersuchung der Ehepartner in den Fällen, in denen ent-

weder nur bei der Frau oder nur beim Mann klinisch oder serologisch eine Lues festgestellt wurde.

In einem Fall erhielten wir bei einer Patientin vierfach positive Reaktionen in den klassischen Reaktionen und in der SER. Der Nelson-Test war positiv. *Der Ehemann zeigte bei wiederholten Kontrollen in den Lipoidbindungsreaktionen und in der SER ein negatives Reaktionsbild.* Für eine in Frage kommende Scheidungsklage war der Nachweis einer eventuell durchgemachten Infektion beim Ehemann von größter Bedeutung. *Bei Untersuchungen im TPI-Test stellten wir auch beim Ehemann einen positiven Befund fest.* Unter der anschließenden Behandlung wurden die Lipoidbindungsreaktionen und die SER positiv.



Abb. 1. Primäraffekt an der Wange

Bei primärer Lues ist nach den Angaben von NELSON, SAUSSE, DUREL, REYN, FRIBOURG-BLANC u. a. der Nelson-Test meist länger negativ als die Flockungsreaktionen, die SER und die Wa.R. Wir beobachteten einen Fall, der klinisch zuerst nicht unbedingt auf eine Lues I schließen ließ. Die Einweisung erfolgte unter der Diagnose „Aktinomykose“. Die regionären Drüsen waren stark angeschwollen und schmerzhaft. Nach mehrmaligen Dunkelfelduntersuchungen konnten zahlreiche Treponemata pallida im Primäraffekt an der linken Wange nachgewiesen werden (Abb. 1).

Die serologische Untersuchung ergab folgendes Bild: Wa.R. Cardiolipin +++, Wa.R. Sitolipin ++, MKR II ++, Citochol +++++, SER negativ, Nelson-Test negativ. Diese Untersuchungen wurden in der 4. Woche nach der mutmaßlichen Infektion durchgeführt. Interessant ist die Anamnese. Der Patient gab an, daß er 3½ Wochen vor der stationären Einweisung einen Mitesser an der linken Wange entfernte, und daß sich einige Tage später an derselben Stelle eine Eiterkruste bildete. Diese wäre von seiner Braut entfernt worden. Sie drückte die Pustel aus und saugte anschließend die Stelle mit dem Munde aus. In den folgenden Tagen vergrößerte sich der Herd langsam. Der Patient wurde von einem Arzt mit Salben und Puder behandelt. Nach 14 Tagen bemerkte Patient eine Schwellung der submandibularen Drüse. Bei der Einweisung fanden wir an der linken Wange ein finger-nagelgroßes, kreisrundes, scharf begrenztes Geschwür, das mit einer braunroten Borke bedeckt war. Im Umkreis des Herdes beobachteten wir einen etwa 1 cm breiten, blaß-hellroten Hof. Die submandibularen Drüsen links waren stark, die präauriculare Drüse derselben Seite in geringem Grade geschwollen.

Besonders interessant erscheint uns, daß in diesem Fall sowohl die SER als auch der TPI-Test ein

eindeutig negatives Ergebnis zeigten. Je länger der Infektionstermin zurückliegt, desto eher ist damit zu rechnen, daß auch spezifische, immobilisierende Antikörper nachweisbar sind. Bei der Untersuchung der Seren einiger Patienten mit Lues I im TPI-Test, den klassischen Reaktionen und der SER fanden wir das in Tabelle 5 aufgezeichnete Resultat.

Tabelle 5. Unbehandelte Lues I

|                   | TPI-Test | Wa.R. | MKR II | Citochol | SER |
|-------------------|----------|-------|--------|----------|-----|
| Positiv . . . . . | 15       | 15    | 17     | 15       | 15  |
| Negativ . . . . . | 4        | 4     | 2      | 4        | 4   |

Bei insgesamt 19 Patienten mit unbehandelter Lues I waren der Nelson-Test, die Wa.R., die Citocholreaktion und SER 15mal positiv. Die MKR II bestätigte in 17 Fällen die klinisch und bakteriologisch gesicherte Diagnose. In 4 Fällen waren der Nelson-Test, die Wa.R. und SER sowie die Citocholreaktion übereinstimmend negativ, trotz des gelungenen Nachweises von Treponemata pallida im Dunkelfeld. In der MKR II waren nur in 2 Fällen noch keine Reagine nachweisbar.

Wir können die Erfahrungen anderer Autoren bestätigen, daß die diagnostische Bedeutung des TPI-Tests bei primärer Lues hinter der der sehr sensiblen Flockungsreaktionen zurücksteht. Auch im Tierversuch konnten wir sehen, daß die Bildung der Immun-Antikörper meist später einsetzte als die der Lipoidreagine. Die Spirochaetales-Eiweißantikörper traten nach unseren experimentellen Tierversuchen meist sehr frühzeitig auf. Es ist deshalb auffallend, daß die Spirochaetales-Eiweißantikörper in dem oben beschriebenen Fall später nachweisbar waren als die Lipoidreagine. Grundsätzlich führen bei Lues I das klinische Bild und der Nachweis des Treponema pallidum im Dunkelfeld meist schneller zu einer Diagnosestellung als der Nachweis der Antikörper und Reagine im Serum. Bei versteckt sitzenden Primäraffekten und klinisch unklaren Zeichen der luischen Erkrankung ist der frühzeitige Nachweis von Reaginen und Antikörpern im Serum nicht zu entbehren.

Bei unbehandelter Lues II fanden wir das in Tabelle 6 angeführte Ergebnis.

Tabelle 6. Unbehandelte Lues II

|                   | TPI-Test | Wa.R. | MKR II | Citochol | SER |
|-------------------|----------|-------|--------|----------|-----|
| Positiv . . . . . | 11       | 11    | 11     | 11       | 11  |
| Negativ . . . . . | —        | —     | —      | —        | —   |

Der Nelson-Test, die klassischen Reaktionen und die SER stimmten völlig überein. In diesem Stadium der Lues ist der heute mögliche Nachweis spezifischer Antikörper nur von untergeordneter Bedeutung. Das klinische Bild, der Erregernachweis im Dunkelfeld und die bisher gebräuchlichen klassischen Reaktionen sichern die Diagnose in praktisch allen Fällen.

Bei tertiärer Lues der Haut finden wir in nahezu 100% der Fälle positive Flockungsreaktionen und eine positive SER (Tabelle 7).

Tabelle 7. Unbehandelte Lues III

|                   | TPI-Test | Wa.R. | MKR II | Citochol | SER |
|-------------------|----------|-------|--------|----------|-----|
| Positiv . . . . . | 16       | 14    | 16     | 16       | 16  |
| Negativ . . . . . | —        | 2     | —      | —        | —   |

Es ist auffallend, daß die Wassermann-Reaktion, die wir bei der Untersuchung dieser Seren nach der Originalmethode unter Verwendung von Cardiolipin und Sitolipin durchführten, in 2 Fällen zu wenig sensibel war und unspezifisch negativ anzeigte. Mit der wesentlich sensibleren Methode der Komplement-bindungsreaktion, wie sie von KOLMER angegeben wurde, fällt nach unseren Erfahrungen auch ein großer Teil der in der Original-Wa.R. negativen Seren positiv aus.

Bei den übrigen Spätformen der Lues waren die Ergebnisse der bisherigen serologischen Diagnostik nicht so überzeugend. *Von allen Untersuchern wird übereinstimmend angegeben, daß der Nelson-Test bis auf das verspätete positive Anzeigen bei primärer Lues in allen Fällen unbehandelter Syphilis positiv reagiert.* Die SER zeigt bei Lues latens und Spätformen der Syphilis ähnliche Schwankungen zwischen positiven und negativen Ausfällen wie die Lipoidbindungsreaktionen.

Die klinische Diagnose der Lues latens ist meistens durch das Fehlen deutlicher Zeichen der Erkrankung sehr erschwert, wenn nicht gar unmöglich. Die sensiblen Flockungsreaktionen, die Kolmer-Komplement-bindungsreaktion und die SER erfassen zwar nicht übereinstimmend den gleichen Patientenkreis, geben uns jedoch in etwa 80% bei Kombination aller Methoden einen Hinweis auf eine durchgemachte Lues. Es war jedoch sehr schwer, in den Fällen, in denen nur eine der Reaktionen positiv anzeigte, und weder klinisch noch anamnestisch ein Hinweis auf die luische Erkrankung gegeben war, die Diagnose Syphilis zu stellen und hieraus die therapeutischen Folgerungen zu ziehen. Man hat früher in diesen Fällen die Reaktionen häufiger wiederholt und zum Teil Provokationsverfahren durchgeführt, doch war die Verantwortung des Arztes bei einem Entschluß zur Therapie mit den oft nicht ungefährlichen therapeutischen Mitteln immer sehr groß. Wir wissen heute auf Grund der Ergebnisse des Nachweises spezifischer Antikörper im TPI-Test, daß in einem nicht unbeträchtlichen Prozentsatz Patienten antiluisch behandelt wurden, die lediglich in den klassischen Reaktionen oder in der SER. unspezifisch positiv reagierten. Bei der Durchuntersuchung unseres Patientenkreises mit behandelter, fraglicher Lues latens fanden wir das in Tabelle 8 wiedergegebene Bild.

Tabelle 8. Behandelte, fragliche Lues latens

|                   | TPI-Test | Wa.R. | MKR II | Citochol | SER |
|-------------------|----------|-------|--------|----------|-----|
| Positiv . . . . . | 142      | 87    | 140    | 141      | 124 |
| Negativ . . . . . | 63       | 118   | 65     | 64       | 81  |

Wenn es sich auch möglicherweise in einzelnen dieser Fälle um einen Erfolg der Therapie und um eine endgültige Heilung handeln kann, so fanden wir doch bei der Untersuchung zahlreicher Seren von Patienten mit angeblicher Lues latens, die auch völlig unzureichend behandelt waren, negative Ausfälle im TPI-Test, die die Richtigkeit der Diagnose sehr in Frage stellten. In zahlreichen Fällen wurde die Diagnose Lues auf Grund positiver Ausfälle in einer oder mehreren der bisher gebräuchlichen Reaktionen gestellt. Der positive Ausfall in den Lipoidbindungsreaktionen hat nach Ansicht NELSONS immer etwas

zu bedeuten und bietet einen Hinweis darauf, daß bei Ausschluß einer Lues durch einen negativen TPI-Test eine vielleicht noch schwerwiegendere Erkrankung als die Lues vorliegt. Sicherlich ist vor der Einführung einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion auf Lues, bei manchem Patienten durch eine falsche Diagnosestellung und nutzlose Therapie, die wirklich vorliegende Erkrankung übersehen worden.

Bei Lues congenita fanden wir, ähnlich wie bei tertiärer Lues der Haut, in fast 100% der Fälle positive Lipoidbindungsreaktion und eine positive SER. Der Nelson-Test ist nach den bisherigen Erfahrungen bei Lues congenita immer positiv. Es muß jedoch daran gedacht werden, daß passiv übertragene Antikörper und Reagine in einzelnen Fällen eine luische Erkrankung vortäuschen können. Nach den Untersuchungen von WEISSMANN und HAMELIN besitzen die immobilisierenden Antikörper eine geringere Molekulargröße als die Lipoidreagine. Auf Grund dieser Struktur ist eine passive Übertragung spezifischer Antikörper vom mütterlichen Organismus auf den des Kindes leichter möglich. Die Aufdeckung derart passiv übertragener Antikörper und ihre Trennung von körpereigenen, d. h. vom Organismus des Kindes selbst gebildeten Antikörpern, ist zumindest in einzelnen Fällen möglich. Mit Hilfe quantitativer Untersuchungen im TPI-Test können wir in den Fällen mit Sicherheit auf eine Erkrankung des Kindes schließen, in denen der Titer der Immobilisine beim Kind höher liegt als bei der Mutter.

Einige besondere Fälle, bei denen wir einerseits an die Möglichkeit eines unspezifischen TPI-Tests gedacht hatten, die andererseits in den Lipoidbindungsreaktionen oder in der SER auffallende Ergebnisse zeigten, möchten wir am Schluß dieses Kapitels über die Bedeutung spezifischer Antikörper hier die Diagnose der Lues im Serum noch anfügen.

1. Ein Patient kam 1952 wegen einer Psoriasis vulgaris zur stationären Aufnahme. Venerische Infektionen wurden negiert. Die obligatorisch durchgeführten serologischen Reaktionen fielen wie folgt aus: Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin negativ, MKR II ++, Citochol negativ, SER negativ. Auf Grund der positiven MKR II führten wir einen Nelson-Test durch, der ein eindeutig positives Ergebnis brachte. Bei neuerlicher Befragung des Patienten stellte es sich heraus, daß bei ihm 1948 eine seronegative Lues festgestellt wurde, die mit 2 Neo-Salvarsan-Wismut-Kuren behandelt wurde. Die serologischen Kontrollen fielen in den folgenden 2 Jahren negativ aus. In diesem Fall führte uns die positive MKR II und die Bestätigung dieses Befundes durch den positiven TPI-Test zur Erkennung einer Lues latens.

2. Ein Patient, ebenfalls mit einer Psoriasis vulgaris, kam 1953 zur stationären Behandlung in unsere Klinik. Die serologischen Reaktionen zeigten folgende Ergebnisse: Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin negativ, Citochol negativ, MKR II ++++, SER ++. Der Nelson-Test war in diesem Fall, auch bei wiederholten Kontrollen, positiv. Eine venerische Infektion wurde zuerst negiert. Bei nochmaliger Befragung unter Hinweis auf den positiven Ausfall in der spezifischen Antigen-Antikörperreaktion auf Lues gab der Patient zu, daß er 1921 eine Lues gehabt habe, die angeblich ausgeheilt wäre.

3. Das Serum eines Patienten wurde uns von der Pol. Sanitätsstelle Bremen zugesandt. In einem Begleitschreiben wurde angegeben, daß man in diesem Fall Zweifel habe, ob die vorübergehend aufgetretenen positiven Reaktionsausfälle in den serologischen Reaktionen spezifisch oder unspezifisch gewesen wären. Da der Patient auswandern sollte, war die Beantwortung dieser Frage für ihn von größter Wichtigkeit. Im April 1952 stellte man positive Flockungsreaktionen fest. Die Behandlung wurde mit Neo-Salvarsan-Wismut eingeleitet. Schon nach den ersten Injektionen trat ein Salvarsan-Ikterus auf, die Behandlung wurde abgebrochen und der Patient wurde

einige Zeit später in die Hautklinik Bremen eingewiesen und erhielt 8 Mill. E Penicillin. Im Anschluß an diese Kur waren die Citochol- und Cardiolipin-Flockungsreaktionen positiv, die Kahn- und Meinicke-Trübungsreaktionen negativ. Es wurde eine weitere Behandlung mit 8 Mill. E Penicillin durchgeführt. Nach dieser Kur war die Cardiolipin-Flockungsreaktion noch positiv, alle übrigen Lipoidbindungsreaktionen negativ. Das Serum wurde daraufhin an das Hygienische Institut Hamburg geschickt. Die dortigen Untersuchungen ergaben folgende Befunde: Wa.R. und Flockungsreaktionen negativ, SER negativ. Auf Grund dieses Befundes und der Negierung einer venerischen Infektion waren nachträglich wieder Zweifel an der Spezifität der früher erhaltenen serologischen Ergebnisse aufgetaucht. Die bei uns im Herbst 1953 vorgenommenen Untersuchungen zeigten folgendes Ergebnis: Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin negativ, MKR II negativ, Citochol negativ, SER negativ, Nelson-Test positiv (δ 96). Auf Grund dieses Ergebnisses konnten wir die Anwesenheit spezifischer Antikörper im Serum dieses Patienten nachweisen und der anfragenden Stelle mitteilen, daß die anti-luische Behandlung zu Recht durchgeführt wurde.

4. Das Serum einer Patientin wurde uns zugeschickt, die an einer lymphatischen Leukämie litt. Bei der Untersuchung des Venenblutes erhielten wir folgende Ergebnisse: Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin ++++, MKR II ++++, quantitativ 512 Meinicke-Einheiten, Citochol ++++. Auf Grund dieses Befundes mit einem derartig hohen Titer in der MKR II hätte man früher mit Sicherheit das Vorliegen einer Lues angenommen. Die SER war negativ. Der Nelson-Test ergab ebenfalls einen negativen Befund. In diesem Fall gelang es uns, durch das Fehlen von Spirochaetales-Eiweißantikörpern und vor allem durch das Nichtvorhandensein spezifischer Antikörper im Serum, die in einem hohen Titerwert vorhandenen Reagine als unspezifisch zu erkennen.

5. Von außerhalb wurde uns das Serum einer Patientin zugeschickt, die nach einem Hundebiß Wundstarrkrampferum vom Pferd erhalten hatte. Die während der erfolgten stationären Behandlung im Krankenhaus durchgeführten serologischen Reaktionen waren in allen Lipoidbindungsreaktionen stark positiv. Das Serum wurde zur Kontrolluntersuchung an ein anderes serologisches Institut geschickt, und von dort wurden ebenfalls stark positive Lipoidbindungsreaktionen mitgeteilt. Auch nach 4 Monaten waren die Reaktionen noch positiv. Wir erhielten nach der Untersuchung dieses Serums folgende Ergebnisse: Wa.R. mit Cardiolipin und Sitolipin ++, MKR II ++++, Citochol ++, SER ++, Nelson-Test negativ.

Wie die im einzelnen angeführten Beispiele zeigen, gelingt es in vielen Fällen nur mit Hilfe des Nachweises spezifischer, das *Treponema pallidum* immobilisierender Antikörper, die Diagnose Lues zu bestätigen oder auszuschließen. Schon seit jeher gab es zahlreiche Fälle, in denen man bis auf den positiven Ausfall in einer oder mehreren der Flockungsreaktionen oder der Komplementbindungsreaktion von einer klinisch symptomlosen Lues latens gesprochen hat. Selbst bei genauester klinischer Untersuchung unter Einschuß von Röntgenkontrollen und Liquordiagnostik konnte man neben dem positiven Ausfall in den serologischen Reaktionen oft keinerlei Hinweis für die durchgemachte Infektion bzw. noch bestehende luische Erkrankung finden. Wenn diese Reaktionen auch über Monate hinweg positiv blieben, oder gar von vornherein einen mittleren oder hohen Titer aufwiesen, entschloß man sich wohl ganz allgemein dazu, eine spezifische Therapie durchzuführen. Für gerade diese Fälle besitzt der Nelson-Test eine entscheidende Bedeutung. Wir können mit dieser spezifischen Reaktion eine Trennung zwischen unspezifischen und spezifischen Ausfällen in den klassischen Reaktionen und in der SER durchführen. Wir sind heute in der Lage, die unspezifischen Ausfälle in den klassischen Reaktionen und auch in der SER zu erkennen und von einer Behandlung abzusehen. Neben der kostspieligen und gerade in diesen Fällen

scheinbar völlig erfolglosen Therapie verhindern wir ein seelisches Trauma, das wohl für die größte Zahl unserer Patienten oft bedeutungsvoller ist als die vermutete venerische Erkrankung. In den anderen Fällen, in denen wir mit Hilfe des Nachweises treponemenspezifischer Antikörper die serologische Diagnostik um einen entscheidenden Beweis bereichern, ist die Therapie dringend angezeigt.

Wir haben schon früher in allen Fällen, in denen ein luisches Kind geboren wurde, auch die Mutter behandelt. In zahlreichen Fällen wird jedoch die luische Erkrankung des Kindes häufig erst an Spätsymptomen erkannt, und die endgültige Diagnose Lues connata ist nicht in allen Fällen zu stellen. Wenn dann bei der Mutter negative klassische serologische Reaktionen gefunden wurden, so entschloß man sich meist nur schwer, die Mutter spezifisch zu behandeln.

Wir konnten, wie schon im einzelnen näher beschrieben, in 3 Fällen bei negativem Ausfall der klassischen Reaktionen und der SER bei den Müttern einen positiven TPI-Test feststellen und sahen dann unter der spezifischen Behandlung das Auftreten von Reaginen, die in den Lipoid-Bindungsreaktionen nachgewiesen werden konnten, und Spirochaetales-Eiweißantikörpern, die wir in der SER feststellten. Auch in diesen Fällen war es nur mit Hilfe des TPI-Tests möglich, die Mütter mit Sicherheit als Infektionsquelle zu erkennen und eine spezifische Behandlung einzuleiten.

Liquoruntersuchungen

Um uns auf Grund eigener Untersuchungen ein Bild über die Verwertbarkeit des TPI-Tests, der SER und der Lipoidbindungsreaktionen für die Diagnose luischer Erkrankungen des Zentralnervensystems zu machen, untersuchten wir 46 Liquores in drei serologischen Reaktionsgruppen. Wir fanden das in Tabelle 9 wiedergegebene Ergebnis.

Tabelle 9. Nachweis verschiedener Antikörper und Reagine im Liquor bei fraglicher Neuro-Lues

|                     | TPI-Test | Wa.R. | MKR II | Citochol | SER |
|---------------------|----------|-------|--------|----------|-----|
| Positiv . . . . .   | 17       | 7     | 11     | 10       | 12  |
| Negativ . . . . .   | 28       | 39    | 35     | 36       | 34  |
| Zweifelhaft . . . . | 1        | —     | —      | —        | —   |

Bei gleichzeitiger Kontrolle der Seren dieser Patienten erhielten wir die in Tabelle 10 wiedergegebenen Befunde.

Tabelle 10. Nachweis verschiedener Antikörper und Reagine im Serum bei fraglicher Neuro-Lues

|                   | TPI-Test | Wa.R. | MKR II | Citochol | SER |
|-------------------|----------|-------|--------|----------|-----|
| Positiv . . . . . | 25       | 12    | 20     | 19       | 20  |
| Negativ . . . . . | 21       | 34    | 26     | 27       | 26  |

Wir stellten fest, daß die Seren aller Patienten, die im Liquor TPI-positiv waren, auch im Serum positiv reagierten. Wir konnten somit die Ergebnisse von McLEOD, NELSON u. a. bestätigen. Diese Autoren geben an, daß bei einem positiven Nelson-Test im Liquor, nach dem Ergebnis ihrer Untersuchungen, immer auch im Serum spezifische Antikörper nachweisbar wären. Im umgekehrten Fall ist jedoch bei

vorheriger Untersuchung des Serums und positivem Ausfall des TPI-Tests nur bei einem geringen Prozentsatz mit einer positiven Reaktion im Liquor zu rechnen. Da die Lipoidbindungsreaktion, die SER und auch die Kolloidreaktionen uns insbesondere bei Tabes in einzelnen Fällen im Stich lassen, ist die Liquordiagnostik durch Anwendung des TPI-Tests wesentlich bereichert worden.

Einzelne Fälle, die durch die Ergebnisse des spezifischen Antikörpernachweises im Liquor geklärt werden konnten, sind im folgenden aufgeführt.

1. Von der Nervenklinik wurde uns der Liquor eines Patienten zugeschiedt. Differentialdiagnostisch kam eine Lues des Zentralnervensystems und eine Sklerose in Frage. Im Liquor waren die Wa.R., MKR II, Citocholreaktion und SER negativ, der Nelson-Test positiv. Bei der Kontrolle des Serums waren die Wa.R. negativ, MKR II ++, Citochol ++, SER ++, Nelson-Test positiv.

2. Der Liquor eines weiteren Patienten, der klinisch mögliche Zeichen einer progressiven Paralyse aufwies, zeigte folgenden Befund: Wa.R., MKR II, Citochol, SER negativ, Nelson-Test negativ. Auch bei der Kontrolle des Blutes erhielten wir negative Resultate.

3. Der Liquor eines Patienten mit fraglicher Taboparalyse wurde uns zur Untersuchung zugeschiedt. Sowohl die Liquoral als auch die Serumuntersuchungen ergaben übereinstimmend in den Lipoidbindungsreaktionen, der SER und im Nelson-Test einen negativen Befund.

4. Der Liquor und das Blut einer Patientin, die eine luische Infektion negierte, wurde uns zur Untersuchung eingeschickt. Der Anfang der Erkrankung lag 10 Jahre zurück und begann mit Schmerzen in beiden Fußsohlen. Im Laufe der folgenden Jahre nahmen die Beschwerden zu, mit leichten Remissionen. Es wurden lancinierende Schmerzen und Paraesthesien in beiden Beinen, Kältehyperpathie am Rumpf und zunehmende Unsicherheit beim Gehen angegeben. Neurologisch wurde folgender Befund erhoben: „Pupillen nicht ganz ideal rund geringe Pupillendifferenz, links weiter als rechts. Vom oberen Drittel beider Unterschenkel nach abwärts zunehmende Hypaesthesiae, verspätete Reizwahrnehmung (Berührungs- und Schmerzreize), hochgradige Störung des Lagegefühls von oberhalb des Knies nach abwärts. Schwere spinale Ataxie in beiden Beinen, so daß die Patientin allein weder stehen noch gehen kann. Fehlende PSR und ASR. Hypotonie und Überstreckbarkeit in beiden Beinen.“ Nach Angaben der Patientin wurden trotz negativen Blut- und Liquorbefunden mehrfach Fieberturen und eine Schmierkur durchgeführt. 1946 war bei der Untersuchung des Liquors eine negative Wa.R., eine positive MKR II, die als unspezifisch angesehen wurde, und eine geringe linksgerichtete Normo-Mastix-Kurve festgestellt worden. Die frühere Diagnose lautete: Multiple Sklerose. Bei unseren Untersuchungen war der Liquor in den klassischen Reaktionen Wa.R., MKR II, Citochol negativ, die SER ++, der Nelson-Test positiv. Das Serum war in der Wa.R. negativ, in der MKR II +, Citochol +, SER zweifelhaft und Nelson-Test positiv.

Diskussion

Da auf Grund der komplizierten Technik des TPI-Tests und der Tatsache, daß nur einige wenige Institute in Deutschland in der Lage sind, diese Reaktion durchzuführen, nicht alle Seren und Liquores auf die Anwesenheit spezifischer, immobilisierender Antikörper geprüft werden können, sollen im folgenden die Fälle skizziert werden, bei denen der TPI-Test angezeigt ist:

1. In allen Fällen, in denen die Differentialdiagnose Lues in Frage kommt und bei denen auf Grund des klinischen Bildes und des Ausfalles der Lipoidbindungsreaktionen und der SER eine eindeutige Diagnosestellung nicht möglich ist.

2. In allen Fällen, in denen in einer oder mehreren der Lipoidbindungsreaktionen oder in der SER bei Routine- oder Reihenuntersuchungen ein positiver Ausfall festgestellt wird.

3. Zur Klärung der Frage einer vor Jahren stattgehabten Infektion.

4. Zur Untersuchung der Ehegatten und Nachkommen von Luikern.

Als Folgerung aus den angeführten Punkten ist festzuhalten, daß der qualitative Nelson-Test in den Fällen unnötig ist, in denen die Diagnose Lues klinisch, bakteriologisch und mit Hilfe der klassischen Serologie eindeutig gesichert werden kann. Insbesondere bei primärer Lues ist die Durchführung eines Nelson-Tests meist unnötig, da die spezifischen Antikörper später nachweisbar sind als die Reagine und Spirochaetales-Eiweißantikörper.

**Zusammenfassung.** Auf Grund der Ergebnisse eigener Vergleichsuntersuchungen bei 858 Patientenserum mit dem Treponema pallidum-Immobilisierungstest, den Lipoidbindungsreaktionen und der „Pallida“-Reaktion (Spirochaetales-Eiweißreaktion, SER) wird die entscheidende Bedeutung des Nachweises spezifischer Antikörper in diagnostischer Hinsicht hervorgehoben. Es werden zunächst die Resultate, die bei der Untersuchung der Seren Luesverdächtiger und unbehandelter Luiker auftraten, tabellarisch geordnet und besprochen. Die Ergebnisse ermöglichen eine Beurteilung des diagnostischen Wertes der einzelnen Reaktionen. Unspezifische Lipoidbindungsreaktionen und SER konnten durch einen negativen Nelson-Test erkannt werden. Neben den unspezifisch positiven Reaktionen in den klassischen Methoden und in der SER ist es durch den Nachweis spezifischer Antikörper möglich, auch unspezifisch negative Reaktionen eindeutig zu erkennen. Auffallende Ergebnisse werden im einzelnen besprochen. In allen Stadien

der Lues, bis auf die ersten Monate nach der Infektion, sind auch nach unseren Erfahrungen bei unbehandelten Patienten immer spezifische Antikörper im Serum nachweisbar. Die besondere Bedeutung des TPI-Tests für differentialdiagnostische Fragen läßt sich aus den Untersuchungsergebnissen bei fraglicher Lues latens am besten erkennen. Die diffizile Technik und die Kostspieligkeit des TPI-Tests gestatten es vorläufig noch nicht, alle in Frage kommenden Seren auf die Anwesenheit spezifischer, immobilisierender Antikörper zu prüfen. Es werden die Fälle hervorgehoben, bei denen der Nelson-Test dringend angezeigt ist.

**Literatur.** DAHR, P.: Dtsch. med. Wschr. 1934, 94. — Med. Welt 1940, 557. — DUREL, P. A., P. SAUSSE, V. COLLART, S. ROIRON et L. J. BOREL: Prophyl. antivener. 23, 59 (1951). FRIBOURG-BLANC: Zit. nach J. CHARPY, Le T. P. I.-Test de Nelson et Mayer. Paris: Masson & Cie. 1953. — GÖTZ, H., u. K. MEINICKE: Arch. f. Dermat. 201, 132 (1955). — GRÜNEBERG, T.: Dermat. Wschr. 1934, 1330. — Dtsch. med. Wschr. 1936, 465. — HÄMEL, J.: Med. Klin. 1949, 47. — KOLMER, J. A.: J. of Exper. Med. 18, 18 (1913). — MARCHIONINI, A., u. K. MEINICKE: Münch. med. Wschr. 1953, 907. — McLEOD, C. H., and J. H. MAGNUSON: J. Vener. Dis. Informat. 32, 274 (1951). — Amer. J. Syph. 37, 9 (1953). — MEINICKE, E., u. R. FISCHER: Klin. Wschr. 1939, 1060. — MEINICKE, K.: Wien. med. Wschr. 1952, 378. — Hautarzt 4, 268 (1953). — NELSON, R. A.: Hautarzt 3, 436 (1952). — NELSON, R. A., and M. MAYER: J. of Exper. Med. 89, 369 (1949). — NEURATH, H., E. VOLKLIN, H. W. CRAIG and J. ERICKSON: Amer. J. Syph. 31, 436 (1947). — PAIC, C. R.: Zit. nach LEVADITI, Acad. Sci. 234, 56 (1952). — REYN, A., u. H. A. NIELSON: Acta dermatovener. 24, 213 (1952). — SANTLER, R., u. G. EHREMAN: Hautarzt 6, 356 (1955). — SAUSSE, A.: Ann. Biol. clin., Paris 10, 490 (1951). — VAISMANN, A., et E. HAMELIN: Presse méd. 1952, 1231.

**Anschrift:** Priv.-Doz. Dr. K. MEINICKE, München 15, Frauenlobstr. 9, Dermatologische Universitätsklinik



Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. A. MARCHIONINI)

## Die Bedeutung der Treponemen-Antigen-Antikörperreaktionen für die Therapie der Lues\*

Von KURT MEINICKE

Bei vielen Infektionskrankheiten ist es schwierig und oft unmöglich, von einer absoluten Heilung zu sprechen. Für die Lues und Tuberkulose gilt dies in ganz besonderem Maße, da bei diesen chronisch verlaufenden Erkrankungen häufig über einen längeren Zeitraum hinweg keine faßbaren klinischen oder bakteriologischen Befunde zu erheben sind und die Krankheit trotzdem zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufflammen kann. Der Begriff der Heilung ist schwer zu definieren. KOGOJ trennt zwischen totaler Heilung und praktischer Heilung, einem Begriff, den schon GOUGEROT im Hinblick auf die Lues prägte. GOUGEROT verstand unter praktischer Heilung die Möglichkeit, einen Luiker bis zum Ende seines Lebens vor allen aus der syphilitischen Infektion entspringenden Schäden zu bewahren. Eine totale Heilung wäre erst dann erreicht, wenn mit Sicherheit keine Treponemen im Organismus des Patienten mehr vorhanden wären. Ein exakter Beweis hierfür wird wohl niemals zu führen sein. Selbst post mortem dürfte es kaum gelingen, zumindest ein negatives Ergebnis auf Grund mikroskopischer Untersuchungen zu verweisen und hieraus Schlüsse zu ziehen. So bleiben uns für die Beurteilung einer Heilung der Lues neben den klinischen Zeichen nur die serologischen Kriterien in verwertbarer Weise verfügbar. War es schon früher schwierig, auf Grund des Ausfalls der klassischen Reaktionen zu einer endgültigen Beurteilung des Heilungserfolges zu gelangen, so ist es jetzt mit Hilfe der Spirochaetales-Eiweißantikörper und der spezifischen Immobilisine nicht leichter geworden.

KOGOJ prägte den *Begriff des kritischen Momentes* in der Syphilistherapie. Er versteht unter dem kritischen Moment in der Luesbehandlung den Zeitpunkt, zu dem weder klinisch noch serologisch nachweisbare Symptome der durchgemachten Erkrankung zu erkennen sind. Er schlägt vor, über diesen Zeitpunkt hinaus noch eine Stabilisierungsbehandlung durchzuführen. Da jedoch spezifische Antikörper meist länger als Lipoidreagine oder Spirochaetales-Eiweißantikörper nachzuweisen sind, ist die Zahl der Patienten, die nach ausreichender Behandlung in allen Reaktionen negativ werden, verhältnismäßig gering. Es steht jedoch fest, daß nach frühzeitig begonnener Behandlung bei primärer und sekundärer Syphilis in zahlreichen Fällen auch ein Verschwinden spezifischer Antikörper im Serum unserer Patienten beobachtet werden kann. In diesen Fällen ist die Sicherheit in der Beurteilung eines Heilungserfolges wesentlich größer. Wir fanden auch einzelne Fälle, in denen Patienten mit

Lues latens nach entsprechender antiluischer Therapie im T.P.I.-Test negativ wurden. Wenn man grundsätzlich auch nach scheinbar ausreichender Behandlung aus der Anwesenheit spezifischer Antikörper im Serum auf das Vorhandensein virulenter Treponemata pallida im Organismus schließen würde, so wäre doch eine kontinuierliche Fortbehandlung kaum zu vertreten. Wir würden nämlich in diesen Fällen — und es handelt sich hierbei um die Mehrzahl aller Patienten mit Lues latens, tertiärer Lues und Neurolues, und vor allem auch der Kinder mit konnataler Lues — grundsätzlich unsere Kranken zu einer lebenslänglichen Therapie verurteilen müssen.

Auch bei der Tuberkulose, die zwar serologisch weniger, dafür aber klinisch-röntgenologisch leichter kontrollierbar ist, behandeln wir nur in extremen Fällen kontinuierlich über Jahre hinaus. So wie bei der Tuberkulose eine jahrzehntelange, in mehr oder minder großen Zeiträumen durchgeführte Röntgenkontrolle Aufschluß über das Krankheitsgeschehen und die eventuelle Notwendigkeit einer neuerlichen Behandlung gibt, so haben wir bei der Lues durch Anwendung serologischer Reaktionen und den Nachweis 3 verschiedener Antikörper die Möglichkeit, irgendwelche Veränderungen im Sinne einer Aktivierung der latent verlaufenden Erkrankung rechtzeitig zu erkennen. Man wird also den von KOGOJ geprägten Begriff des kritischen Momentes in der Syphilistherapie nur in verhältnismäßig wenigen Fällen erreichen, und so wichtig und einleuchtend uns diese Formulierung des kritischen Momentes auch erscheint, so werden wir in der Praxis vor allem den Fällen unsere besondere Beachtung schenken müssen, die diesen kritischen Moment in der Therapie nicht erreichen, d. h. die Fälle, die auch nach langdauernder Behandlung nicht serologisch negativ werden. Es fragt sich jedoch, ob wir grundsätzlich bei der Behandlung der Lues eine Begrenzung der Gesamtdosis der uns zur Verfügung stehenden Therapeutica vornehmen sollen, wobei die Tagesdosis und der Zeitfaktor von wesentlicher Bedeutung sind, oder ob wir in jedem Fall eine individuelle Beurteilung der Notwendigkeit einer Fortsetzung der Therapie vornehmen wollen. Auf Grund der Vieltätigkeit des serologischen Reaktionsbildes und des oft so völlig gegensätzlichen Verhaltens der Antikörperbildung bei klinisch ähnlich gelagerten Fällen ergibt sich unseres Erachtens die Notwendigkeit, die Beurteilung einer Fortsetzung der Therapie von Fall zu Fall vorzunehmen. Der Entschluß, die Therapie fortzusetzen, ist abhängig von dem klinischen Verlauf, dem serologischen Reaktionsbild während der Behandlung und der bisher durchgeführten Therapie. Um zu einer

\* Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür ihr auch an dieser Stelle nochmals gedankt sei.

verwertbaren Beurteilung des serologischen Reaktionsbildes vor, während und nach der Behandlung zu gelangen, genügen jedoch weder die routinemäßig durchgeführten qualitativen klassischen Reaktionen, noch qualitative Untersuchungen mit der Spirochaetales-Eiweißreaktion oder dem Nelson-Test. Es muß von vornherein nach der Aufdeckung der Lues quantitativ serologisch untersucht werden. Diese Forderung ist bei ausschließlicher Verwendung der klassischen Methoden oft recht schwierig zu erfüllen, da die Lipoid-Bindungsreaktionen im Verlauf der unbehandelten Lues teilweise wieder negativ werden oder nur zweifelhaft bis schwach positiv reagieren. Nach der Einführung der Spirochaetales-Eiweißreaktion durch GAEHTGENS gab es zahlreiche Fälle, die zumindest in dieser Reaktion einen höheren Titer aufwiesen als die Lipoid-Bindungsreaktionen. Bei Anwendung des Treponema pallidum-Immobilisierungstests von NELSON und MAYER finden wir bis auf das Primär- und Sekundärstadium in allen Fällen unbehandelter Lues bei quantitativer Untersuchung einen verhältnismäßig hohen Titerwert. Der Abfall des Titers läßt Rückschlüsse auf den Erfolg der Therapie zu. Da jedoch in zahlreichen Fällen kein völliges Verschwinden der Antikörper und Reagine beobachtet werden kann, wird man die Fortführung der Therapie bis zu einem gewissen Grade von der Titerhöhe und Konstanz der serologischen Befunde abhängig machen müssen.

Vorläufig ist eine routinemäßige quantitative Untersuchung im Nelson-Test nur in einigen wenigen Fällen möglich. Man ist deshalb darauf angewiesen, diese quantitativen Untersuchungen vorerst in den Lipoid-Bindungsreaktionen und in der S.E.R. durchzuführen. Nach unseren Erfahrungen eignet sich für die quantitative Untersuchung der Reagine besonders die sehr sensible Meinicke-Klärungsreaktion II. Wir haben an anderer Stelle die quantitative Methodik dieser Reaktion unter Benutzung einer gepufferten Kochsalzlösung und unter Hinzufügung schuttkolloidaler Substanzen näher beschrieben. Grundsätzlich eignet sich eine Flockungsreaktion zur Durchführung quantitativer Untersuchungen besser als eine Komplement-Bindungsreaktion. Die Nachteile einer quantitativen Komplement-Bindungsreaktion sind durch die diffizilere Technik und die täglich schwankenden Faktoren Komplement und Hammelblut bedingt. Sind jedoch bei Aufdeckung einer Lues nur die S.E.R. und der Nelson-Test positiv, so ist es zweckmäßig, die S.E.R. und eventuell auch den Nelson-Test von vornherein quantitativ auszuwerten. Ohne quantitative Kontrolle vor und während der Behandlung ist eine Beurteilung des Heilungserfolges und die Entscheidung, ob die Therapie fortgesetzt werden soll, kaum möglich.

Der quantitative Nachweis spezifischer Antikörper im T.P.I.-Test wird in Zukunft für die Beurteilung des Therapieerfolges und die Notwendigkeit einer weiteren Behandlung von wesentlicher Bedeutung sein. Die Schwierigkeit, im Nelson-Test bei Untersuchung der Seren an verschiedenen Tagen gleiche Titerwerte zu erhalten, entsteht dadurch, daß die Anzahl der Treponemen und damit die quantitative Zusammensetzung des Antigens schwankt. Der Titer ist im Nelson-Test wesentlich höher als in den klassischen serologischen Reaktionen. Niedrige Titer oder zweifelhafte Ausfälle sind ein Hinweis dafür, daß zwar Kontrollen weiterhin

notwendig sind, daß jedoch von einer weiteren Therapie abgesehen werden kann, vorausgesetzt, daß eine ausreichende Vorbehandlung durchgeführt wurde. In den klassischen Reaktionen und in der S.E.R., die man vorerst noch zur Beurteilung des Therapieerfolges in größerem Maßstab heranziehen wird, ist ein Abfall auf 16, 4 oder 2 Einheiten unter Berücksichtigung des Anfangstiters ein Hinweis auf die Notwendigkeit der Fortführung oder Unterbrechung der spezifischen Behandlung. Schwierig ist die Beurteilung in den Fällen, in denen der Nelson-Test nach vorangegangener Therapie zwar negativ geworden ist, die klassischen Reaktionen und die S.E.R. jedoch noch positiv sind. Man möchte sagen, daß die positiven Befunde in den klassischen Reaktionen und in der S.E.R. beim Fehlen spezifischer Antikörper unspezifischen Reaktionsausfällen gleichzusetzen wären. Wenn wir auch dieser Ansicht sehr zuneigen, so ist doch zu bedenken, daß der Nelson-Test bis auf die Anfangsstadien der Lues nach den bisherigen Erfahrungen bei unbehandelter Lues zwar immer positiv wird, daß er jedoch, als Einzelreaktion gesehen, nicht sehr sensibel ist, d. h., die Antikörper müssen schon in einer gewissen Menge vorhanden sein, damit es zu einem positiven Ausfall des T.P.I.-Tests kommt. Gerade bei einem Vergleich des T.P.I.-Tests mit der Agglutinationsreaktion mit Treponemata pallida bzw. dem Treponema pallidum-Immun-Adhärenztest zeigt es sich, daß hier noch in einzelnen Fällen spezifische Antikörper nachweisbar waren, obwohl der Nelson-Test noch oder schon negativ anzeigte. Da es bei der Anwesenheit virulenter Treponemen im Organismus des Patienten und bei Aktivierung des luischen Prozesses auch neuerlich zum Anstieg des spezifischen Antikörpertiters kommen würde, ist zu erwarten, daß in diesen Fällen auch der Nelson-Test wieder positiv wird. Wenn also nach abgeschlossener Behandlung der Nelson-Test bei mehrmaliger Wiederholung in Abständen von Monaten bzw. Jahren negativ bleibt, so kann nach unseren heutigen Erfahrungen von einer endgültigen Heilung der Lues gesprochen werden. In den Tabellen 1—4 sind die von uns gefundenen Ergebnisse zusammengestellt, die nach entsprechender antiluischer Behandlung in den einzelnen Reaktionen gefunden wurden.

#### *Serum- und Liquoruntersuchungen*

Bei behandelter Lues I fanden wir das in Tabelle 1 wiedergegebene Resultat.

Tabelle 1. Ausfall des T.P.I.-Testes, der Lipoid-Bindungsreaktionen und der Spirochaetales-Eiweißreaktion bei behandelter Lues I

|               | T.P.I.-<br>Test | Wa.R. | M.K.R II | Citochol | S.E.R. |
|---------------|-----------------|-------|----------|----------|--------|
| Positiv . . . | 14              | 4     | 8        | 8        | 9      |
| Negativ . . . | 20              | 30    | 26       | 26       | 25     |

Wie aus der Tabelle ersichtlich, sind trotz vorausgegangener Behandlung die meisten positiven Ausfälle im T.P.I.-Test zu finden. Die Wa.R. zeigt auch hier, wie bei allen vorhergehenden Untersuchungen, die geringste Übereinstimmung mit der spezifischen Antigen-Antikörperreaktion im T.P.I.-Test. In sechs Fällen sind die Flockungsreaktionen schon negativ geworden, obwohl noch spezifische Antikörper nachweisbar sind. Die S.E.R. zeigt in 5 Fällen ein negatives

Ergebnis bei positivem T.P.I.-Test. In 58% war der Nelson-Test bei behandelter Lues I schon negativ geworden. Wir haben bei negativen Lipoid-Bindungsreaktionen und negativer S.E.R. auf Grund des positiven Ausfalls im T.P.I.-Test weiterbehandelt. Es ist zu erwarten, daß ein Teil der Seren dieser Patienten im Nelson-Test noch negativ wird. Wir untersuchten 23 Patienten mit behandelter Lues II in den 5 verschiedenen Reaktionen und erhielten das in Tabelle 2 aufgezeichnete Ergebnis. Nach behandelter, sekundärer Lues finden wir in einem größeren Prozentsatz als bei behandelter Lues I spezifische immobilisierende Antikörper.

Tabelle 2. Ausfall des T.P.I.-Tests, der Lipoid-Bindungsreaktionen und der S.E.R. bei behandelter Lues II

|               | T.P.I.-Test | Wa.R. | M.K.R II | Citochol | S.E.R. |
|---------------|-------------|-------|----------|----------|--------|
| Positiv . . . | 12          | 4     | 6        | 5        | 6      |
| Negativ . . . | 5           | 19    | 17       | 18       | 17     |
| Zweifelhaft . | 6           | —     | —        | —        | —      |

Von 23 Seren zeigen nur 5 keine spezifischen Antikörper mehr, 6 sind zweifelhaft. Es ist zu erwarten, daß diese 6 Seren bei Fortführung der Therapie in absehbarer Zeit negativ werden. Die S.E.R. zeigt auch hier noch verhältnismäßig oft positiv an. Die Beendigung der Behandlung und Durchführung einer sog. Sicherheitskur bei negativen Lipoid-Bindungsreaktionen ist nach diesen Ergebnissen sicherlich oft zu frühzeitig durchgeführt worden. Man wird die spezifische Therapie in Zukunft auf Grund des positiven Ausfalles im Nelson-Test und in der S.E.R. zu einem späteren Zeitpunkt abschließen müssen. Der kritische Moment (Kogoj) in der Luestherapie tritt bei Anwendung des T.P.I.-Tests und der S.E.R. in zahlreichen Fällen zu einem späteren Zeitpunkt ein als bei alleiniger Untersuchung der Seren in den Lipoid-Bindungsreaktionen. Bei Lues congenita, Lues III und Neurolues fanden wir die in Tabelle 3 aufgezeichneten Befunde. In keinem Fall ist trotz langdauernder Behandlung ein negativer Nelson-Test zu verzeichnen. Die größte Übereinstimmung mit dem Nelson-Test zeigen auch hier die Flockungsreaktionen und die S.E.R.

Tabelle 3. Ausfall des T.P.I.-Tests, der Lipoid-Bindungsreaktionen und der S.E.R. bei behandelter Lues congenita, Lues III und Neurolues

|               | T.P.I.-Test | Wa.R. | M.K.R II | Citochol | S.E.R. |
|---------------|-------------|-------|----------|----------|--------|
| Positiv . . . | 48          | 34    | 46       | 39       | 39     |
| Negativ . . . | —           | 14    | 2        | 9        | 9      |
| Gesamtzahl .  | 48          | 48    | 48       | 48       | 48     |

In den ersten 8 Jahren nach dem Kriege wurden in Bayern insgesamt 92939 luische Erkrankungen aufgedeckt und dem Gesundheitsamt gemeldet. Wir wiesen an anderer Stelle schon darauf hin, daß diese Zahlen mit Sicherheit zu niedrig liegen und man annehmen kann, daß ein großer Teil der Patienten nicht gemeldet wurde und deshalb in diesen Zahlen nicht enthalten ist. Nach Schätzungen wurden in den ersten 8 Nachkriegsjahren wahrscheinlich über 150000 Luiker in Bayern erstmalig behandelt. Die Mehrzahl der neu aufgedeckten Luesfälle gehört in die Gruppe der

latenten Luiker. Auch in Zukunft wird die Erkennung und Behandlung dieses Patientenkreises von vordringlicher Bedeutung sein. Durch den Nachweis spezifischer Antikörper im Serum Syphiliskranker ist es möglich, die Diagnose Lues latens auch ohne sichtbare klinische Zeichen zu verifizieren. Welche Aufschlüsse über den Erfolg unserer Therapie bei behandelter Lues latens erhalten wir nun durch den qualitativen Nachweis spezifischer Antikörper? Auf Grund der in Tabelle 3 angeführten Ergebnisse und der daraus resultierenden geringen Aussicht einer endgültigen Serumsanierung bei verschiedenen Spätformen der Syphilis war vorauszusehen, daß auch bei einer großen Anzahl latenter Luiker trotz langdauernder Behandlung noch Treponema pallidum-immobilisierende Antikörper im Serum vorhanden sein würden. Überrascht waren wir jedoch über die unverhältnismäßig große Zahl der positiven Befunde im T.P.I.-Test nach Durchführung der in Deutschland üblichen Therapie. In der Tabelle 4 haben wir die Ergebnisse aufgezeichnet, die wir auf Grund des Nachweises drei verschiedener Antikörper bzw. Reagine im Serum von 263 behandelten Lues latens-Patienten erhielten.

Tabelle 4. Ausfall des T.P.I.-Tests, der Lipoid-Bindungsreaktionen und der S.E.R. bei behandelter Lues latens

|               | T.P.I.-Test | Wa.R. | M.K.R II | Citochol | S.E.R. |
|---------------|-------------|-------|----------|----------|--------|
| Positiv . . . | 223         | 124   | 165      | 174      | 169    |
| Negativ . . . | 28          | 139   | 98       | 89       | 94     |
| Zweifelhaft . | 12          | —     | —        | —        | —      |
| Gesamtzahl .  | 263         | 263   | 263      | 263      | 263    |

Von 263 Patienten zeigten nur 28 nach teilweise jahrelanger Behandlung mit zahlreichen Neosalvarsan-Wismut- und Penicillinuren einen negativen Befund im T.P.I.-Test. 12 Seren reagierten bei der Untersuchung im Nelson-Test zweifelhaft. In diesen Fällen ist anzunehmen, daß der geringe Antikörperspiegel, der für die zweifelhaften Ergebnisse verantwortlich ist, voraussichtlich noch bis zum Negativen absinken wird. Die Flockungsreaktionen und die S.E.R. waren zwar in etwa 50 der T.P.I.-positiven Fälle negativ, zeigten jedoch im Vergleich miteinander bei annähernd der gleichen Zahl der untersuchten Seren noch einen positiven Befund. Die Titerwerte lagen in der M.K.R. II in keinem dieser Fälle über 62 Meinicke-Einheiten. Die Wa.R. war in weiteren 50 Fällen negativ und zeigte auch bei der Untersuchung des Patientenkreises mit behandelter Lues latens die geringste Übereinstimmung mit dem T.P.I.-Test.

Von besonderem Interesse ist die Aufschlüsselung der 28 Fälle, die im Nelson-Test negativ reagierten. Diese 28 Fälle waren nicht in allen Reaktionen übereinstimmend negativ. Negativ in allen Reaktionen waren letztlich nur 13 Seren. Ein Serum reagierte nur in der Wa.R., 2 Seren nur in der M.K.R. II, 1 Serum nur in der Citocholreaktion und 2 Seren nur in der S.E.R. positiv. In den übrigen 9 Fällen waren meist die Flockungsreaktionen und die S.E.R. gemeinsam positiv. Die Ausfälle in den Lipoid-Bindungsreaktionen und der S.E.R. bei diesen Nelson-Test-negativen Seren schwankten zwischen zweifelhaft und + + + +. Nur in 2 Fällen beobachteten wir einen Titer von 8 und 16 Einheiten in der M.K.R. II. Die

Erfolge hinsichtlich einer vollständigen Serumsanierung sind bei einer kurzen Anamnese der Lues latens wesentlich günstiger als bei einem lange zurückliegenden Infektionstermin vor Einleitung der Behandlung. Der Begriff Lues latens ist mit Sicherheit zu weit gefaßt und manche Fälle, die kurze Zeit nach Abklingen der Sekundärerscheinungen der Lues durch eine serologische Untersuchung erkannt werden, gehören im Hinblick auf den möglichen Therapieerfolg mehr zur Gruppe der Lues II als zu der der Lues latens.

### Diskussion

Wir konnten im Verlauf der letzten 3 Jahre den T.P.I.-Test, die Lipoid-Bindungsreaktionen und die S.E.R. vor, während und nach der Behandlung bei Patienten mit primärer und sekundärer Lues kontrollieren. Wir beobachteten Fälle, die es uns auch bei alleiniger qualitativer Durchführung dieser Antigen-Antikörperreaktionen auf Lues gestatteten, Rückschlüsse auf den Behandlungserfolg zu ziehen. Der Nelson-Test war in einem Teil dieser Fälle vor Beginn der Behandlung positiv oder wurde es während der Behandlung, um dann nach Durchführung mehrerer Kuren negativ zu werden. Auch bei mehrmaliger Wiederholung, die sich bei unserem Untersuchungsmaterial in einzelnen Fällen über  $1\frac{1}{2}$  Jahre erstreckte, blieben der Nelson-Test und alle übrigen Reaktionen negativ. Wir halten in Übereinstimmung mit KOGOJ eine Stabilisierungsbehandlung nach Eintreten des kritischen Momentes in der Luestherapie für zweckmäßig. Es fragt sich nun, ob ein negativer T.P.I.-Test und gleichzeitig negative Lipoid-Bindungsreaktionen sowie negative Spirochaetales-Eiweißreaktionen den seit langem gesuchten Beweis der Heilung führen können. Die Schwierigkeit der Feststellung einer endgültigen Heilung haben wir im Vorhergehenden näher erörtert. Allein mit Hilfe serologischer Reaktionen wird diese Frage kaum endgültig beantwortet werden können. Zumindest besitzen wir durch die Möglichkeit, einen endgültigen Schwund spezifischer Antikörper im Serum zu konstatieren, ein bedeutungsvolles Kriterium für die Beurteilung des Therapieerfolges. Es wird erst nach jahrelangen Untersuchungen mit spezifischen Antigen-Antikörperreaktionen unter gleichzeitiger genauer Verfolgung des klinischen Verlaufes möglich sein, die Bedeutung positiver oder negativer Ausfälle bzw. die Bewertung des Titerabfalls im T.P.I.-Test bei behandelter Lues endgültig zu erkennen. Vor allem muß die Frage noch beantwortet werden, ob ein völliger Schwund spezifischer Antikörper nach durchgeführter Therapie spätere Rezidive ausschließt und ob in diesen Fällen niemals Spätfolgen der Lues, insbesondere Erkrankungen des Zentralnervensystems, erwartet werden können.

Für die therapeutischen Entscheidungen besitzt der negative T.P.I.-Test nach behandelter Lues eine erhebliche Bedeutung. Bei allen Spätformen der Lues wiesen wir in der Mehrzahl der Fälle trotz scheinbar ausreichender Behandlung einen positiven Nelson-Test nach. Welche Folgerungen sind nun aus der Fortdauer der Positivität eines T.P.I.-Tests bei behan-

delter Lues zu ziehen? Der T.P.I.-Test ist eine serologische Reaktion, die letztlich nur das Vorhandensein von Antikörpern anzeigt. Das Problem, warum diese Antikörper nach langdauernder Behandlung trotz des Fehlens klinischer Zeichen noch vorhanden sind, ist mehr eine Frage der Immunitätsforschung als der Serologie. Um verwertbare Schlüsse auch aus einem positiven T.P.I.-Test ziehen zu können, sind quantitative Untersuchungen erforderlich. Auf die Schwierigkeiten und die Fehlermöglichkeiten derartiger Untersuchungen im T.P.I.-Test haben wir hingewiesen. Wir konnten eine größere Zahl quantitativer Untersuchungen im T.P.I.-Test nicht durchführen, ohne hierdurch nicht gleichzeitig die qualitativen Untersuchungen wesentlich reduzieren zu müssen. Zwei Untersucher sind in der Lage, an 2 Tagen insgesamt 40 Seren bzw. Liquores qualitativ zu untersuchen. Bei quantitativer Auswertung des T.P.I.-Testes würden von den Untersuchern im gleichen Zeitraum nur vier Seren bearbeitet werden können. Man wird sich deshalb vorerst noch auf quantitative Untersuchungen in den Lipoid-Bindungsreaktionen und in der Spirochaetales-Eiweißreaktion beschränken müssen. Mit Hilfe einer Kontrolle des Lipoidreagin- bzw. Spirochaetales-Eiweiß-Antikörpertiters ist es auch heute schon möglich, in den meisten Fällen den Therapieerfolg zu kontrollieren.

**Zusammenfassung.** Der qualitative Nachweis spezifischer Antikörper besitzt bei behandelter Lues nicht die gleiche Entscheidungskraft wie bei unbehandelter. Die alleinige qualitative Untersuchung im T.P.I.-Test gestattet nur in wenigen Fällen primärer und sekundärer Lues eine Beurteilung des Therapieerfolges. Nur der konstant negative Nelson-Test erlaubt bei behandelter Lues einen Rückschluß auf die mögliche Heilung. Einen näheren Einblick in die Wechselbeziehungen zwischen Therapie und Antikörpertiter kann man durch quantitative Untersuchungen im T.P.I.-Test erhalten. Bei allen Spätformen der Lues fanden wir in der Mehrzahl der Fälle trotz scheinbar ausreichender Therapie einen positiven T.P.I.-Test.

Unter Ausschluß primärer und sekundärer Lues fanden wir bei 311 Patienten mit behandelter Lues nur in 28 Fällen einen eindeutig negativen T.P.I.-Test.

Mit Hilfe serologischer Reaktionen allein ist die Frage einer endgültigen Heilung der Lues kaum mit Sicherheit zu beantworten. Durch die besondere Schwierigkeit der quantitativen Kontrolle spezifischer Antikörper im T.P.I.-Test sind wir vorerst auf Beobachtungen des Reagin- bzw. Spirochaetales-Eiweiß-Antikörpertiters vor, während und nach der Behandlung angewiesen.

**Literatur.** GAETGENS, W.: Med. Klin. 1929, 390. — GUGEROT, H.: Bull. Acad. Nat. Méd. (Paris) 135, 7 (1938). — KOGOJ, FR.: Serol. Tagg Wien 1950. Wien: Hollinek. — Hautarzt 6, 511 (1955). — MARCHIONINI, A., u. K. MEINICKE: Münch. med. Wschr. 1953, 907. — MEINICKE, K.: Hautarzt 4, 268 (1953). — NELSON, R. A., and M. MAYER: J. of Exper. Med. 89, 369 (1949). — Hautarzt 3, 436 (1952).

**Anschrift:** Priv.-Doz. Dr. K. MEINICKE, München 15, Frauenlobstr. 9, Dermatologische Universitäts-Klinik



